

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 22 novembre 2000 (22.11.00)	
Demande internationale no PCT/FR00/01102	Référence du dossier du déposant ou du mandataire B13286.3 MDT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 26 avril 2000 (26.04.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 29 avril 1999 (29.04.99)
Déposant AUZELY-VELTY, Rachel etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

20 octobre 2000 (20.10.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

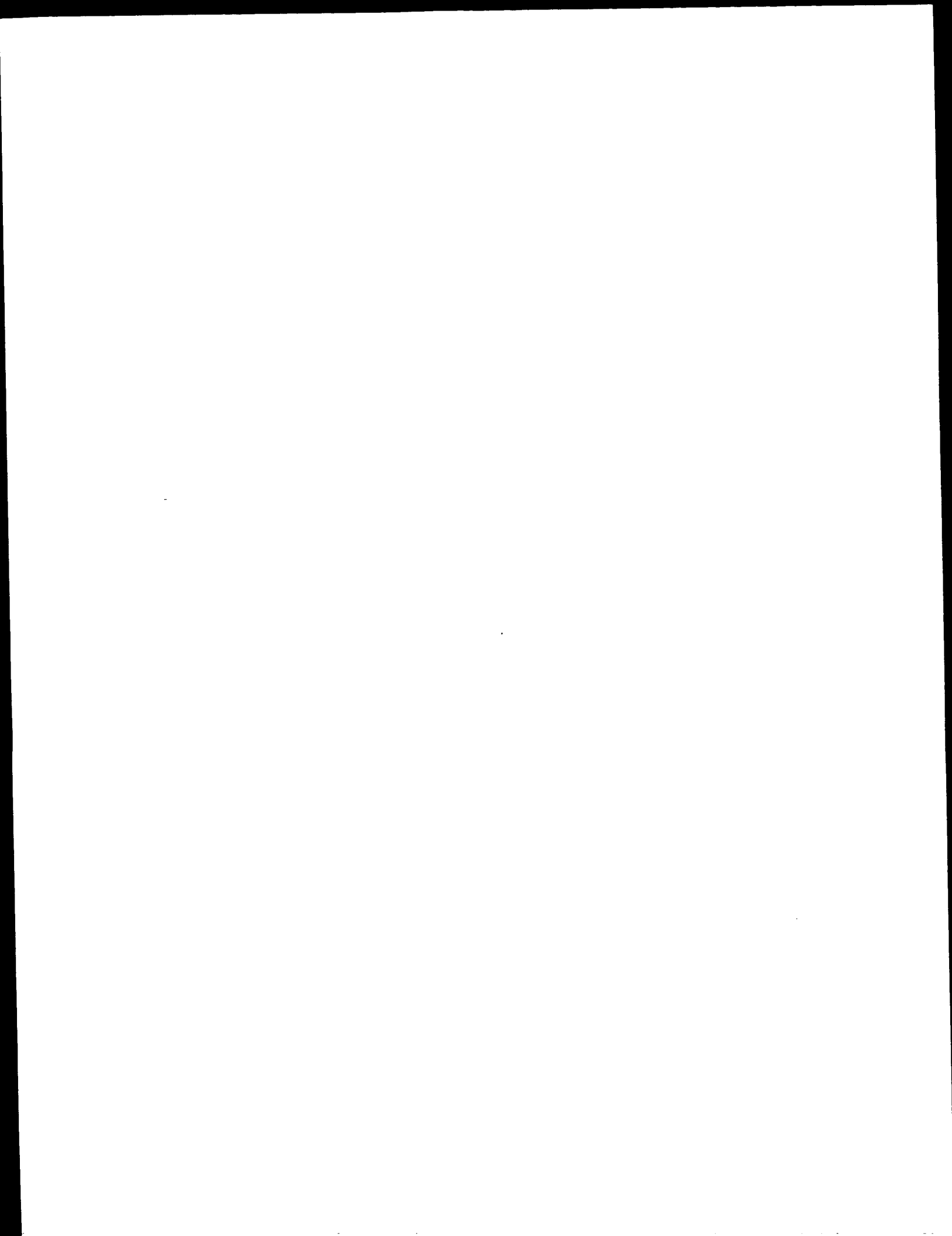
Bureau international de l'OMPI  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38



09/92 6413  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600 2000

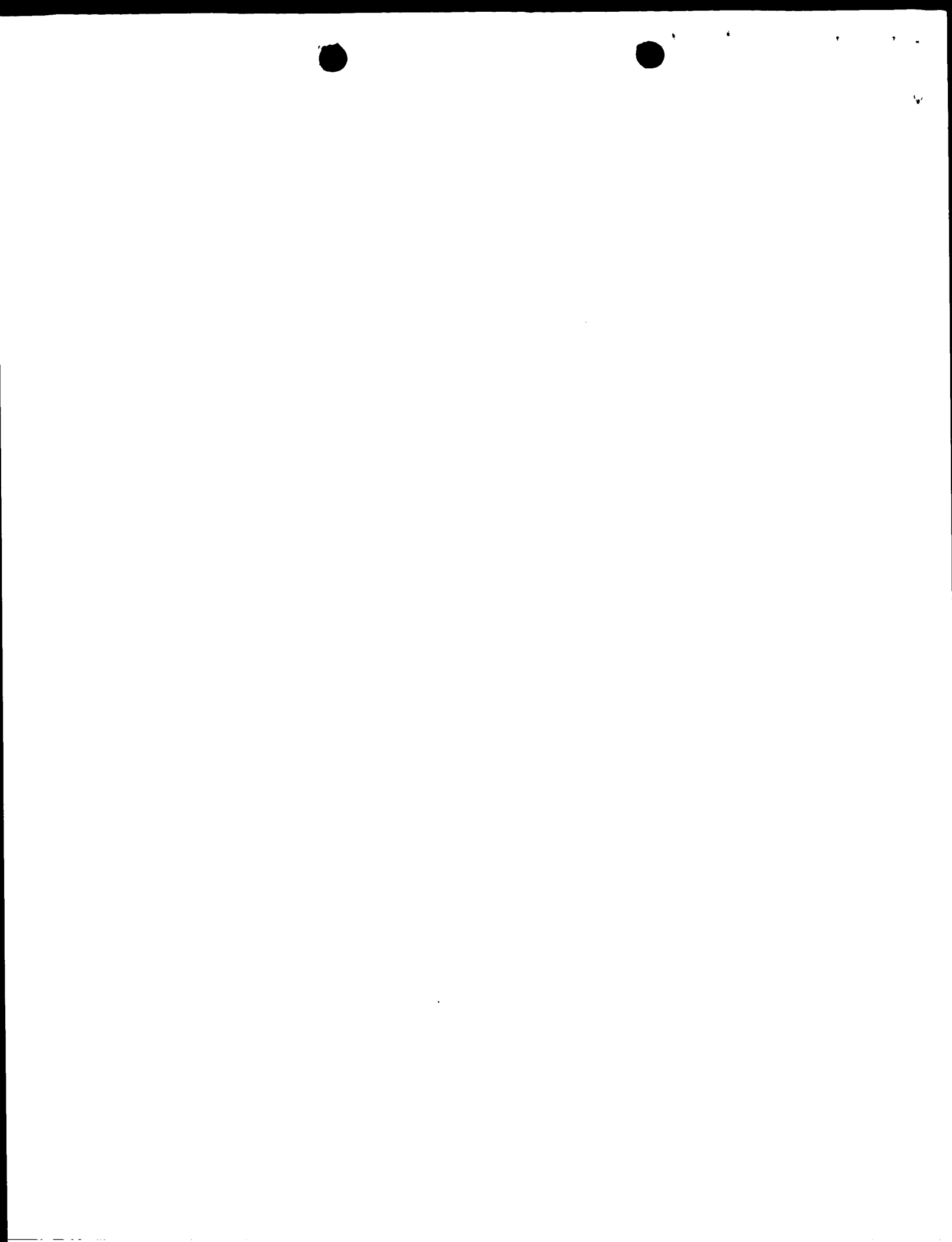
APR 08 2002

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference B13286.3 MDT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01102	International filing date (day/month/year) 26 April 2000 (26.04.00)	Priority date (day/month/year) 29 April 1999 (29.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08B 37/16		
Applicant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.	
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).	
These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input checked="" type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 20 October 2000 (20.10.00)	Date of completion of this report 02 April 2001 (02.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01102

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-17,19-21,23-31, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages 18,22, filed with the letter of 10 March 2001 (10.03.2001)
- ☒ the claims:  
pages 1-16, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages 1/3-3/3, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

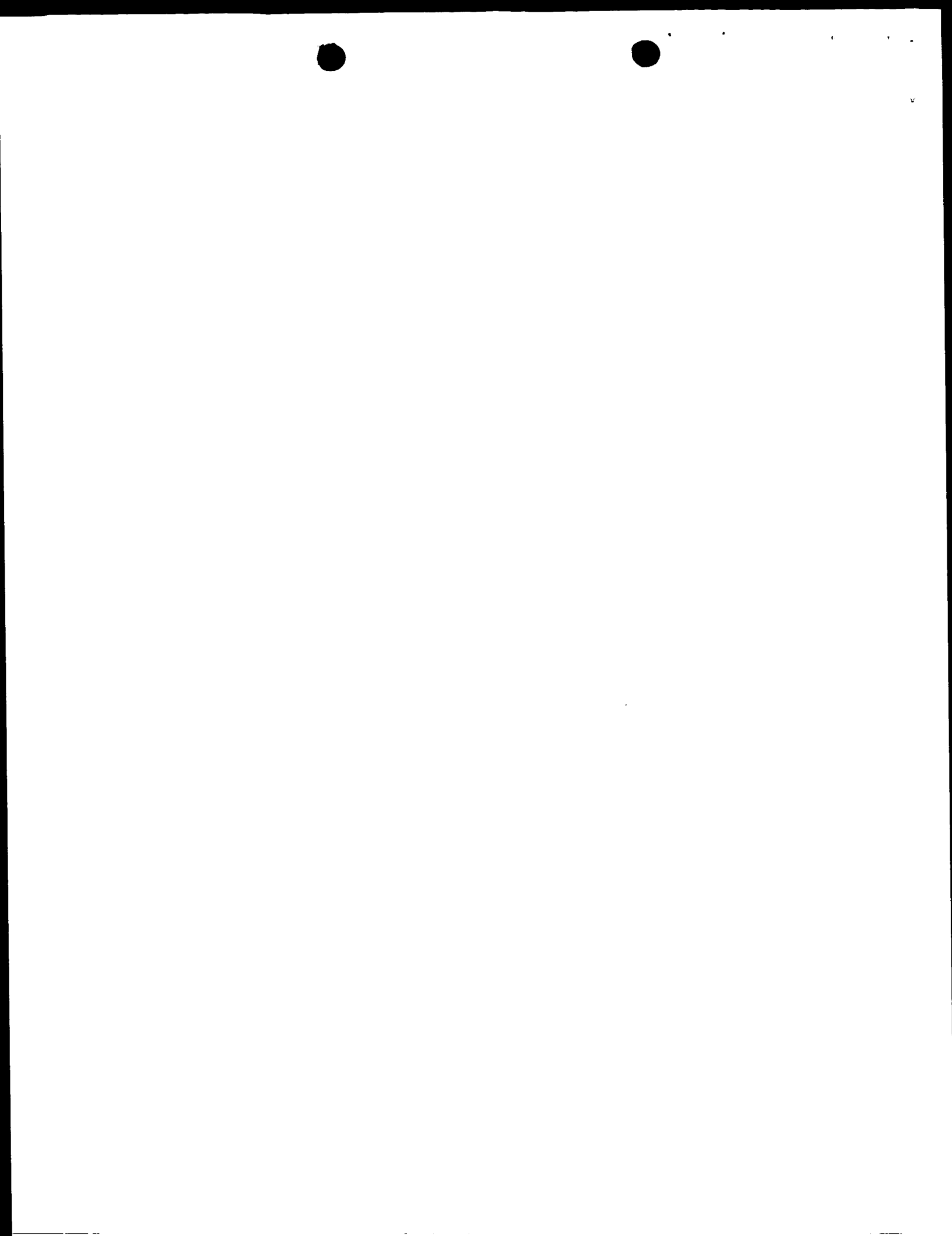
4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01102

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

The following documents are referred to:

D1: FR-A-2 681 868 (SEDERMA SA) 2 April 1993

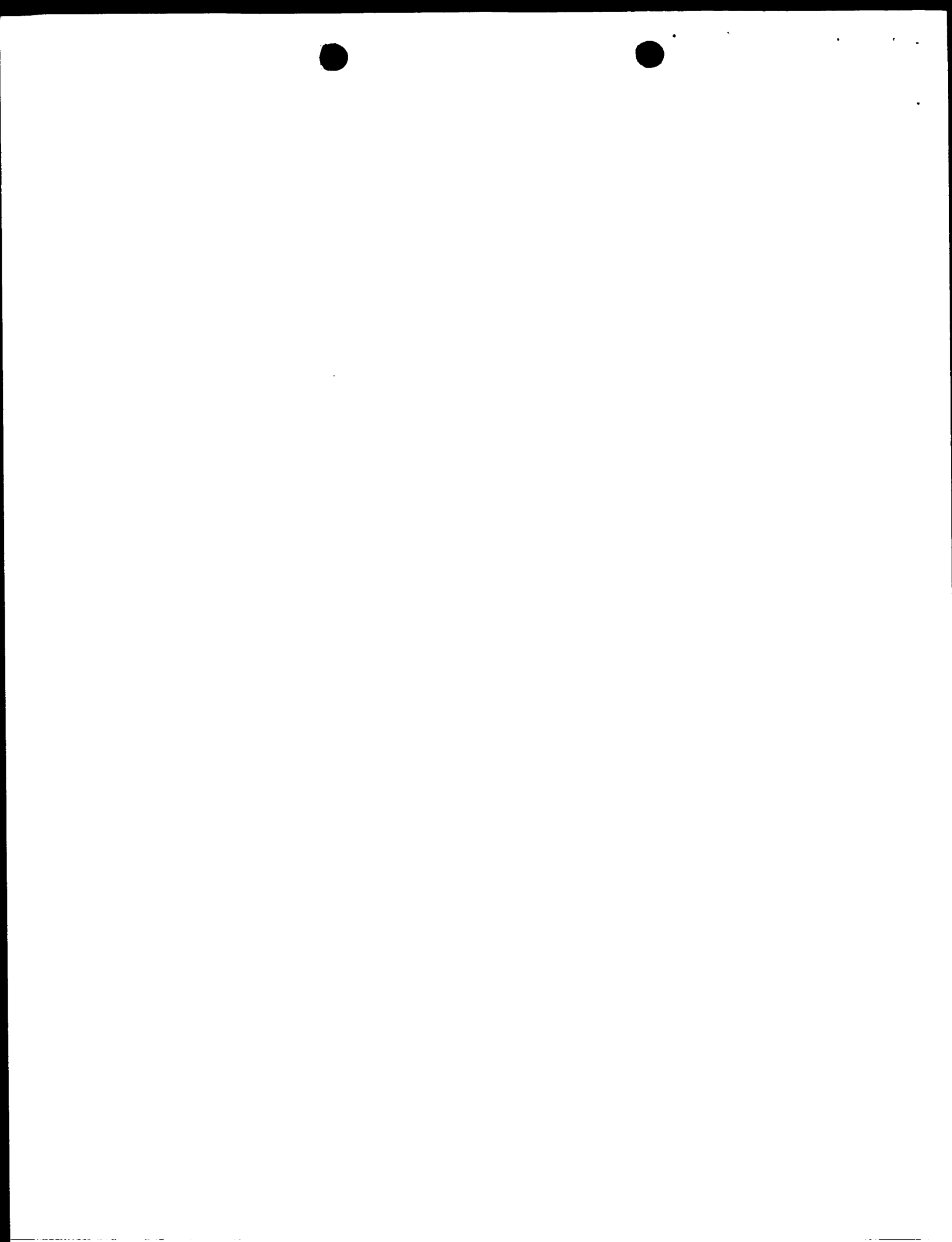
D2: EP-A-0 751 150 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE)  
2 January 1997 & FR-A-2 736 056 (CEA) 3 January  
1997, cited in the application.

**1. Novelty**

The subject matter of **Claims 1-16** is novel in relation to the available prior art (PCT Article 33(2)).

D1, which represents the closest prior art, describes amphiphilic cyclodextrin derivatives obtained by attaching fatty chains to the primary hydroxyl groups of the glycosyl residues (see compound (IV) on page 4, lines 1-6, consisting of cyclodextrins mono-modified at position 6 in which X = -NH-CO-R, R being a straight or branched C6 to C20 alkyl chain, optionally saturated and optionally hydroxylated). These cyclodextrin derivatives are used in cosmetic compositions and in pharmaceutical applications.

The cyclodextrin derivatives of Claims 1 and 7 are distinguished from that of D1 by the presence of a group derived from a steroid at the end of the aliphatic chain.





## 2. Inventive Step

- 2.1 The subject matter of **Claims 1-7** is inventive (PCT Article 33(3)).

The technical problem addressed by the present invention can be considered to be that of providing amphiphilic cyclodextrin derivatives which are stable in physiological media, capable of including hydrophobic chemical compounds, readily incorporated into organised surfactant systems leading to the formation of mixed systems, and which have self-organisation properties in aqueous media.

Neither D1 nor D2 suggests that the alkyl grouping R of D1 should be replaced by a substituent derived from a steroid in order to obtain the desired effects.

Furthermore, the cyclodextrin derivatives of D2 are not stable in physiological media; their ability to be incorporated in organised systems remains limited; and they do not spontaneously self-organise in aqueous media so as to provide particles with well defined dimensions and shapes.

The cyclodextrin derivatives of D1 do not possess the ability to self-organise and are not stable in physiological media. A comparison between Example 8 of D1 and the description of the present application (page 18, lines 25-27; and page 28, lines 18-25) shows that the cyclodextrin derivatives of the present application lead to the formation of mixed spherical aggregates of DMPC/cyclodextrin when brought into contact with an aqueous suspension of DMPC (clear, transparent

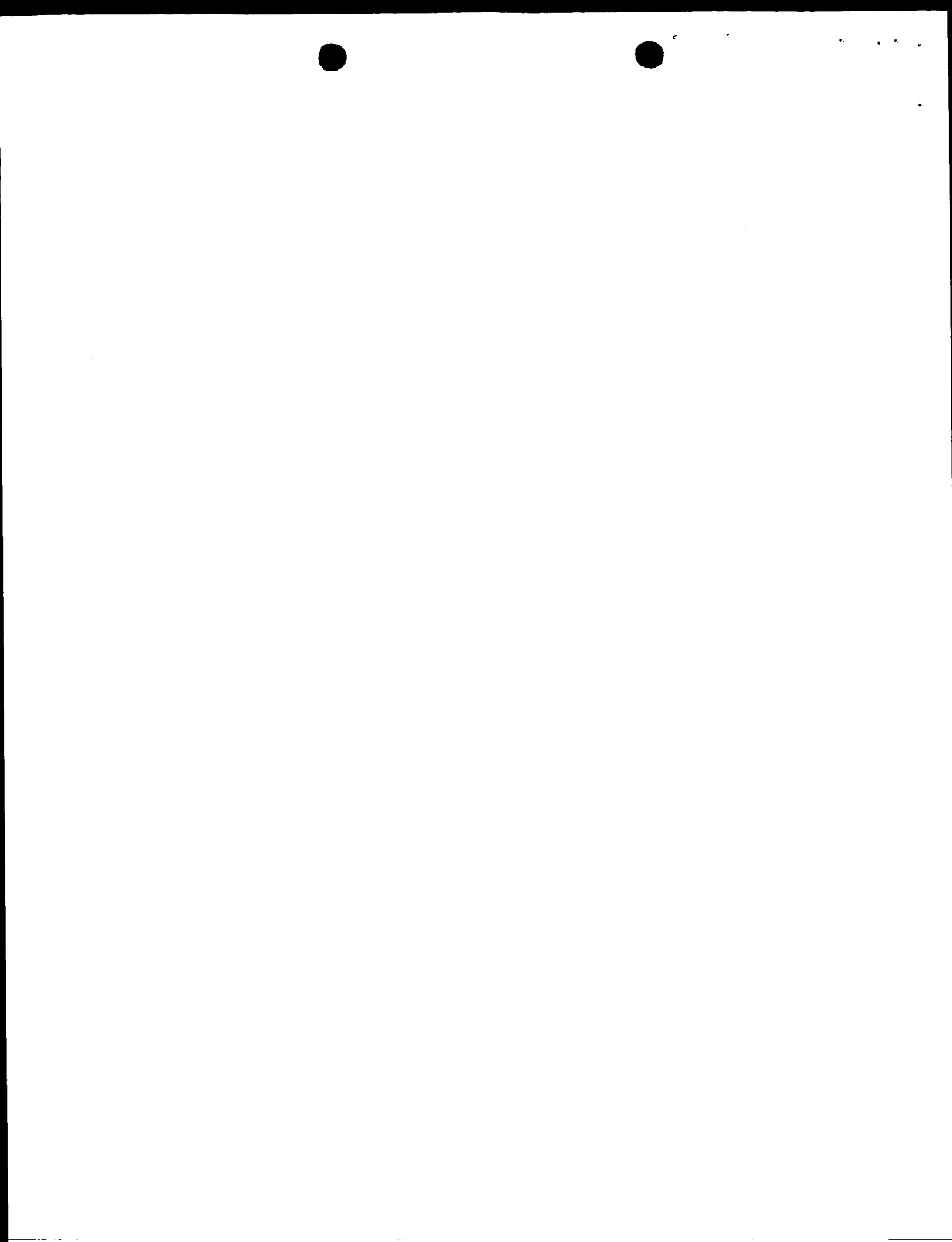


solution), which is not the case in D1 (opalescent solution).

- 2.2 The subject matter of **Claims 8-16**, concerning a method for preparing an amphiphilic cyclodextrin derivative as per Claim 1, inclusion complexes of cyclodextrin derivatives as per Claims 1-7, an aqueous solution of nanoparticles of a cyclodextrin derivative as per one of Claims 1-7 and an inclusion complex as per one of Claims 10-12; is likewise inventive (PCT Article 33(3)).

### 3. Industrial Applicability

The subject matter of **Claims 1-16** is industrially applicable (PCT Article 33(4)(a)(i)).



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

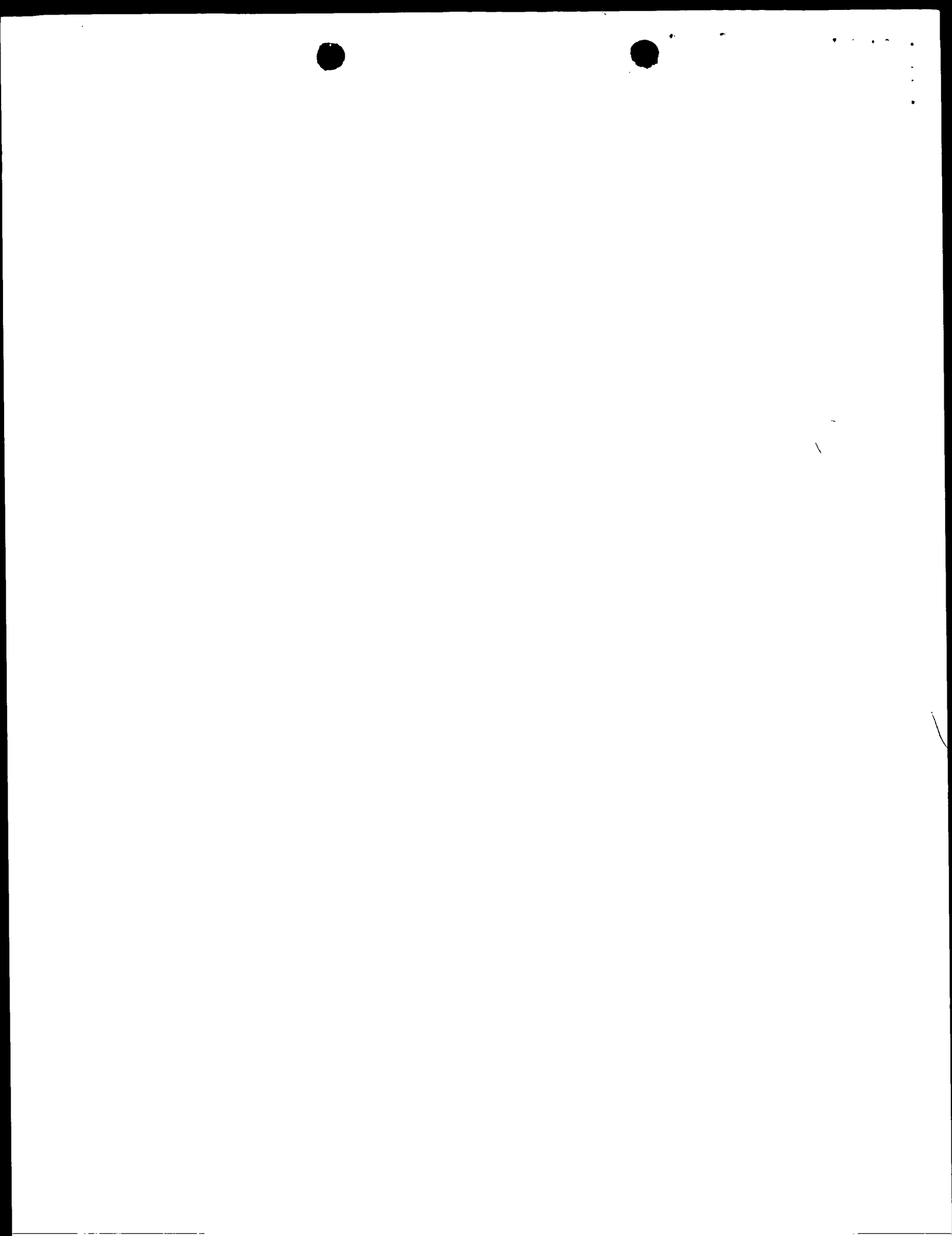
International application No.

PCT/FR 00/01102

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii),  
neither D1 nor the relevant prior art disclosed in that  
document is mentioned in the description.



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

DES TERMES, Monique  
Brevatome  
3, rue du Docteur Lancereaux  
F-75008 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 14 juin 2000 (14.06.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B13286.3 MDT	
Demande internationale no PCT/FR00/01102	Date du dépôt international (jour/mois/année) 26 avril 2000 (26.04.00)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 29 avril 1999 (29.04.99)
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un **astérisque(\*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les **lettres "NR"** figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
29 avri 1999 (29.04.99)	99/05460	FR	22 mai 2000 (22.05.00)

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Philippe Bécamel
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38





PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Destinataire:

DES TERMES, Monique  
Brevatome  
3, rue du Docteur Lancereaux  
F-75008 Paris  
FRANCE

**BREVATOME**

**17 NOV. 2000**

Date d'expédition (jour/mois/année)

09 novembre 2000 (09.11.00)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

B13286.3 MDT

3, rue du Docteur Lancereaux  
75008 PARIS

**AVIS IMPORTANT**

Demande internationale no

PCT/FR00/01102

Date du dépôt international (jour/mois/année)

26 avril 2000 (26.04.00)

Date de priorité (jour/mois/année)

29 avril 1999 (29.04.99)

Déposant

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:  
US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:  
EP,JP

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 09 novembre 2000 (09.11.00) sous le numéro WO 00/66635

**RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)**

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

**RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))**

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

J. Zahra

no de téléphone (41-22) 338.83.38



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/01102

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08B37/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 681 868 A (SEDERMA SA) 2 April 1993 (1993-04-02) page 3, line 5 -page 4, line 5	1,8,9
A	EP 0 751 150 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 2 January 1997 (1997-01-02) & FR 2 736 056 A (CEA) 3 January 1997 (1997-01-03) cited in the application	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 2000

Date of mailing of the international search report

09/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01102

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2681868	A	02-04-1993	NONE	
EP 751150	A	02-01-1997	FR 2736056 A	03-01-1997
			AU 699482 B	03-12-1998
			AU 5616496 A	09-01-1997
			HU 9601791 A	28-05-1997
			JP 9012605 A	14-01-1997
			US 5821349 A	13-10-1998

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C08B 37/16</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/66635</b>
		(43) Date de publication internationale: 9 novembre 2000 (09.11.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01102

(22) Date de dépôt international: 26 avril 2000 (26.04.00)

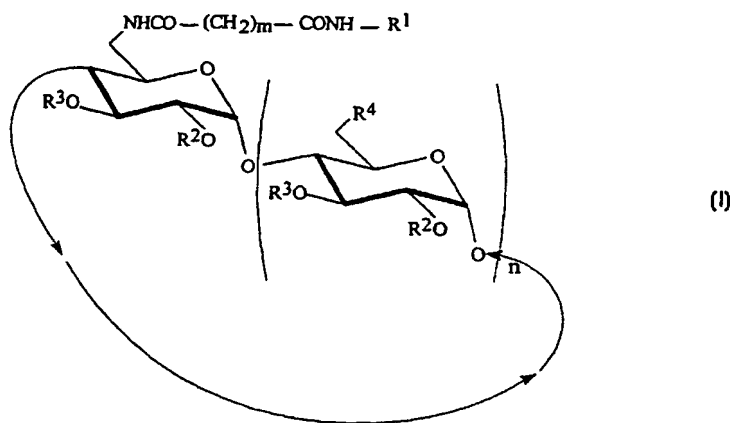
(30) Données relatives à la priorité:  
99/05460 29 avril 1999 (29.04.99) FR(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMIS-  
SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue  
de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AUZELY-VELTY,  
Rachel [FR/FR]; 8, rue Paul Breton, F-38800 le Pont  
de Claix (FR). PERLY, Bruno [FR/FR]; 7, rue Auguste  
Bernard, F-78320 la Verrière (FR). DJEDAINI-PILARD,  
Florence [FR/FR]; 21, rue du Bas des Fiefs, F-91150  
Etampes (FR).(74) Mandataire: DES TERMES, Monique; Brevatome, 3, rue du  
Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: AMPHIPHILE CYCLODEXTRINS, PREPARATION AND USE THEREOF FOR SOLUBILISING ORGANISED SYSTEMS  
AND INCORPORATING HYDROPHOBIC MOLECULES(54) Titre: CYCLODEXTRINES AMPHIPHILES, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION POUR SOLUBILISER DES  
SYSTEMES ORGANISES ET INCORPORER DES MOLECULES HYDROPHOBES

## (57) Abstract

The invention concerns cyclodextrin derivatives of formula (I) wherein: R<sup>1</sup> represents a group derived from a steroid; R<sup>2</sup> represents an alkyl or an aryl group optionally substituted; R<sup>3</sup> represents H or R<sup>2</sup>; all the R<sup>4</sup> represent OR<sup>2</sup>, or one of the R<sup>4</sup> represents -NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONHR<sup>1</sup>. Said derivatives are useful for transporting hydrophobic molecules for pharmaceutical or cosmetic uses, by forming organised systems in an aqueous medium, independently or associated with phospholipids.

(57) Abrégé

L'invention concerne des dérivés de cyclodextrine de formule (I) dans laquelle: R<sup>1</sup> représente un groupe dérivé d'un stéroïde, R<sup>2</sup> représente un groupe alkyle ou aryle éventuellement substitué, R<sup>3</sup> représente H ou R<sup>2</sup>, tous les R<sup>4</sup> représentent OR<sup>2</sup>, ou l'un des R<sup>4</sup> représente -NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONHR<sup>1</sup>. Ces dérivés permettent d'assurer le transport de molécules hydrophobes pour des applications pharmaceutiques ou cosmétiques, en formant des systèmes organisés en milieu aqueux, seuls ou avec des phospholipides.

*UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**CYCLODEXTRINES AMPHIPHILES, LEUR PREPARATION ET LEUR  
UTILISATION POUR SOLUBILISER DES SYSTEMES ORGANISES ET  
INCORPORER DES MOLECULES HYDROPHOBES.**

**DESCRIPTION**

**5    Domaine technique**

La présente invention a pour objet de nouveaux dérivés de cyclodextrines, utilisables en particulier pour l'incorporation en milieu aqueux de composés chimiques hydrophobes tels que des molécules  
10 pharmaceutiquement actives, des molécules à applications cosmétiques et des molécules utilisées comme agents de contraste pour l'imagerie médicale.

De façon plus précise, elle concerne des dérivés amphiphiles de cyclodextrines présentant des  
15 propriétés d'auto-organisation en milieu aqueux et étant susceptibles de s'incorporer dans des systèmes de tensioactifs organisés conduisant à la formation de systèmes mixtes.

Cette incorporation dans des systèmes de  
20 tensioactifs organisés tels que des petites vésicules de phospholipides, est destinée à permettre le transport de molécules hydrophobes incluses dans la cyclodextrine, par exemple d'un principe actif, en particulier par voie transmembranaire, par exemple  
25 transdermique.

## État de la technique antérieure

Les cyclodextrines ou cyclomaltooligosaccharides sont des composés d'origine naturelle formés par l'enchaînement de 6, 7 ou 8 unités glucose liées en  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4. De nombreux travaux ont montré que ces composés pouvaient former des complexes d'inclusion avec des molécules hydrophobes permettant ainsi leur solubilisation dans des milieux aqueux. De nombreuses applications ont été proposées pour tirer profit de ce phénomène, en particulier dans le domaine pharmaceutique, comme il est décrit par D. Duchêne, dans « Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins », paru dans « Cyclodextrins and their industrial uses », Editions de Santé, Paris 1987, pp. 213-257 [1]. Des compositions pharmaceutiques utilisant des cyclodextrines ont déjà été commercialisées au Japon, en Italie et plus récemment en France, par exemple par Pierre Fabre Médicament pour le Brexin® qui est un complexe d'inclusion du Piroxicam dans la  $\beta$ -cyclodextrine.

Parmi les cyclodextrines utilisables, la  $\beta$ -cyclodextrine (comportant 7 unités glucose), est la plus adaptée au niveau de la taille de sa cavité et la moins chère des trois. Des modifications chimiques de la  $\beta$ -cyclodextrine ont été décrites afin de la rendre amphiphile dans le but de l'incorporer à des systèmes organisés.

Ainsi, des cyclodextrines amphiphiles portant de multiples chaînes sur la face primaire ont été étudiées. A. Yabe et coll ont décrit dans « Thin



Solid Films, (1988), 160, pp. 33-41 [2], le dérivé per(6-dodécylamino-6-désoxy)- $\beta$ -cyclodextrine afin de former des couches de Langmuir-Blodgett stables. De même, L. Jullien et coll ont décrit dans J. Chem. Soc. Perkin Trans 2, 1993, pp. 1011-1022 [3], des dérivés de  $\beta$ -cyclodextrine comportant des chaînes aliphatiques situées en positions primaires et secondaires, en vue d'incorporer ces dérivés de cyclodextrines dans des vésicules de phosphatidylcholine. Ces dérivés sont amphiphiles et peuvent être incorporés dans les vésicules, mais la cavité interne de la cyclodextrine n'est plus accessible en raison du fort encombrement stérique des chaînes aliphatiques. Par conséquent, ces dérivés sont incapables d'inclure des molécules hydrophobes, en particulier des molécules de principe actif.

Récemment, il a été montré par A. Gulik et coll dans Langmuir (1998), 14, pp. 1050-1057 [4], que des cyclodextrines dites à « jupes », portant des chaînes d'acides gras greffées sur les hydroxyles secondaires pouvaient former des nanosphères stables. Ces super-assemblages moléculaires semblent présenter des propriétés d'encapsulation et de relargage très prometteuses en raison des effets cumulatifs de la spécificité de taille et de transport des cyclodextrines, d'une part, et d'organisation des nanoparticules, d'autre part. Toutefois, il faut souligner que la synthèse et surtout la purification de telles cyclodextrines restent très difficiles et nécessitent de longues étapes de purification conduisant à de faibles rendements. Il est évident que

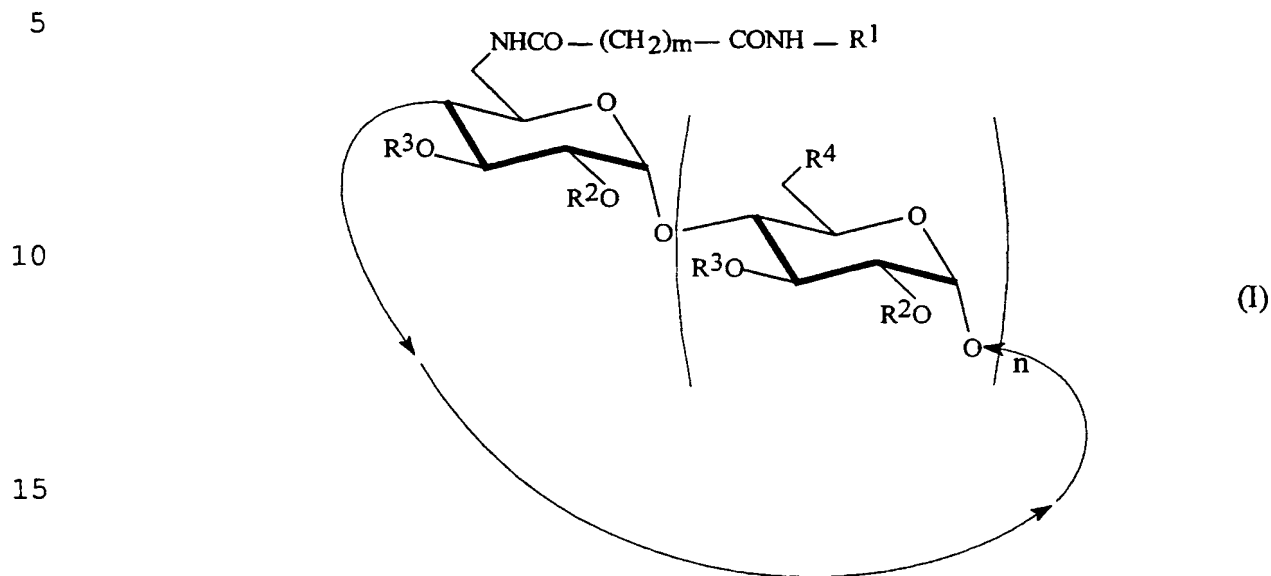
les propriétés d'organisation supramoléculaire sont drastiquement liées à la pureté chimique des dérivés de cyclodextrines amphiphiles.

J. Lin et coll ont décrit dans  
5 FR-A-2 736 056 [5] et dans J. Chem. Soc. Perkin Trans  
2, (1998), pp. 2638-2646 [6], la synthèse de dérivés de  
cyclodextrines appelées « Bilboquets » comportant une  
ou plusieurs chaînes aliphatiques leur conférant des  
propriétés amphiphiles sans conduire pour autant au  
10 phénomène d'auto-inclusion de la ou des chaînes dans la  
cyclodextrine. De ce fait, on peut obtenir à partir de  
tels dérivés des complexes d'inclusion contenant une  
molécule hydrophobe et l'incorporation de ces complexes  
dans des vésicules phospholipidiques. Toutefois, ces  
15 molécules se sont révélées peu stables en milieu  
physiologique, soit à des pH égaux et supérieurs à 7,  
et leurs capacités d'incorporation dans des systèmes  
organisés restent limitées. De plus, ces molécules  
Bilboquets ne s'auto-organisent pas spontanément en  
20 milieu aqueux pour donner des particules de taille et  
de forme bien définies.

### Exposé de l'invention

La présente invention a précisément pour  
objet des dérivés amphiphiles de cyclodextrines,  
25 stables en milieu physiologique, susceptibles d'inclure  
des composés hydrophobes, ayant de bonnes capacités  
d'incorporation dans des systèmes organisés et  
présentant de plus des propriétés d'auto-organisation  
en milieu aqueux.

Selon l'invention, le dérivé amphiphile de cyclodextrine répondant à la formule :

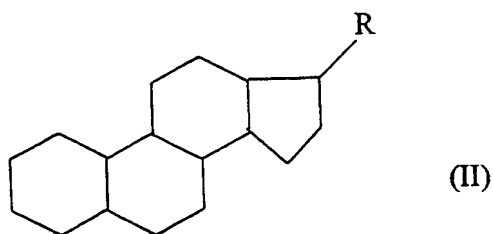


dans laquelle :

- $R^1$  représente un groupe dérivé d'un stéroïde,
- 20 -  $R^2$  représente un groupe alkyle ou aryle éventuellement substitué,
- $R^3$  représente H ou  $R^2$ ,
- tous les  $R^4$  représentent  $OR^2$ , ou
- l'un des  $R^4$  représente  $-NHCO(CH_2)_mCONHR^1$  et les autres
- 25  $R^4$  représentent  $OR^2$  à condition qu'il y ait au moins une unité glucose avec  $R^4$  représentant  $OR^2$  entre les deux unités glucose comportant le substituant  $-NHCO-(CH_2)_m-CONH-R^1$ ,
- m est un nombre entier allant de 1 à 8, et
- 30 - n est égal à 5, 6 ou 7.

On rappelle que les stéroïdes sont des composés dérivant d'un noyau polycyclique de formule :

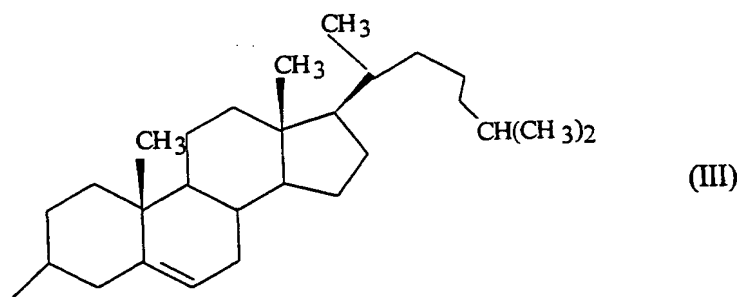
5



dans laquelle R représente un groupe hydrocarboné  
 10 linéaire ou ramifié de 1 à 9 atomes de carbone, et  
 dans lesquels le noyau polycyclique peut comporter une  
 ou plusieurs doubles liaisons, et un ou plusieurs  
 substituants choisis parmi CH<sub>3</sub>, OH et O, sur un ou  
 plusieurs atomes de carbone des cycles

15 Dans le dérivé de cyclodextrine de  
 l'invention, R<sup>1</sup> peut représenter un groupe dérivé des  
 stéroïdes par élimination du groupe hydroxyle du premier  
 cycle, ayant un degré d'insaturation de 0 à 6. Il peut  
 s'agir aussi de groupes dérivés de stérones. Par  
 20 exemple R<sup>1</sup> peut représenter un groupe dérivé du  
 cholestérol tel que le groupe de formule :

25



30

Dans le dérivé de l'invention, on obtient  
 les propriétés amphiphiles grâce à la présence d'un ou

deux substituants comportant un groupe dérivé d'un stéroïde.

Lorsque le dérivé comporte deux substituants de ce type, il est nécessaire qu'ils ne se trouvent pas sur deux unités glucose adjacentes de la cyclodextrine, en raison de leur encombrement.

Aussi, les deux unités glucose comportant ces substituants sont séparées par une ou deux unités glucose ayant un substituant  $OR^2$ .

De préférence, le dérivé de cyclodextrine ne comporte qu'un seul substituant de ce type, tous les  $R^4$  représentant  $OR^2$ .

Dans le dérivé de cyclodextrine de l'invention, le groupe  $R^2$  représente un groupement alkyle linéaire ou ramifié ou aryle, éventuellement substitué. Lorsque l'on utilise un groupe alkyle, celui-ci a généralement de 1 à 4 atomes de carbone et il est de préférence linéaire. Le groupe aryle peut être par exemple le groupe phényle ou le groupe benzyle. Les substituants éventuels de ces groupes alkyle ou aryle peuvent être par exemple des atomes d'halogènes et des groupes hydroxyle, carboxyle et amine. Avantageusement,  $R^2$  représente le groupe méthyle.

$R^3$  peut représenter un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle identique ou différent de  $R^2$ . De préférence,  $R^3$  représente H.

Dans la formule (I) donnée ci-dessus, la chaîne aliphatique reliant le groupe dérivé d'un stéroïde à l'unité glucose peut comporter entre les

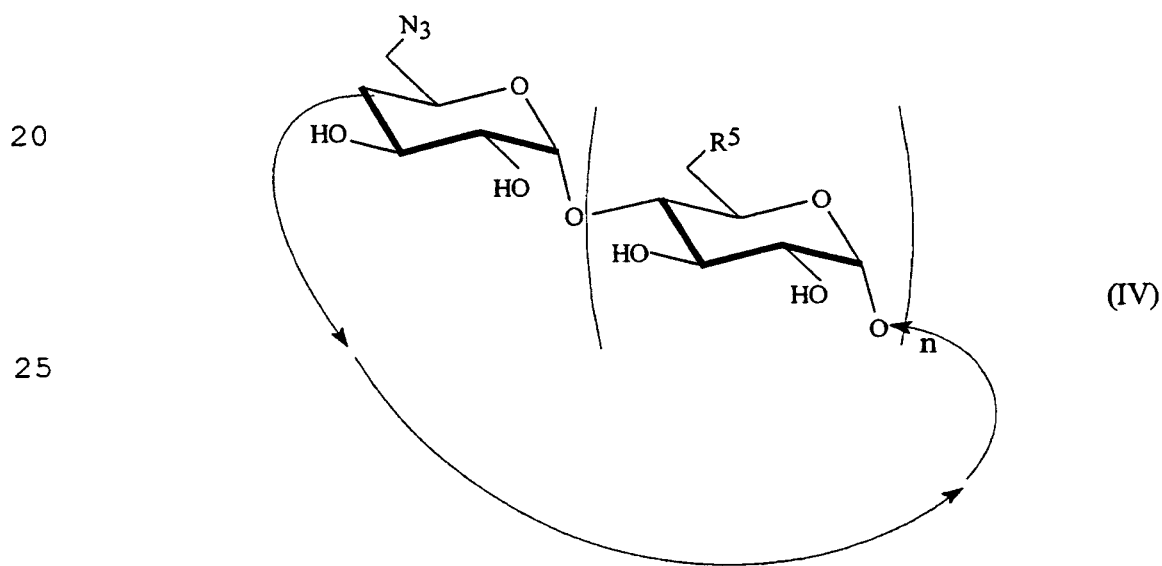
deux groupes amido, de 1 à 8 atomes de carbone. On obtient de bons résultats avec deux atomes de carbone, soit avec  $m$  égal à 2.

Les dérivés de cyclodextrine de l'invention peuvent être des dérivés de l' $\alpha$ -,  $\beta$ - ou  $\gamma$ -CD. De préférence, on utilise les dérivés de la  $\beta$ -CD ce qui correspond dans la formule (I) donnée ci-dessus au cas où  $n$  est égal à 6.

Les dérivés de cyclodextrine de l'invention peuvent être préparés par des procédés classiques à partir des dérivés mono-azido ou diazido de cyclodextrines correspondants.

Dans le cas où l'on veut préparer un dérivé de formule (I) tel que défini ci-dessus avec  $R^3$  représentant un atome d'hydrogène, le procédé comprend les étapes suivantes :

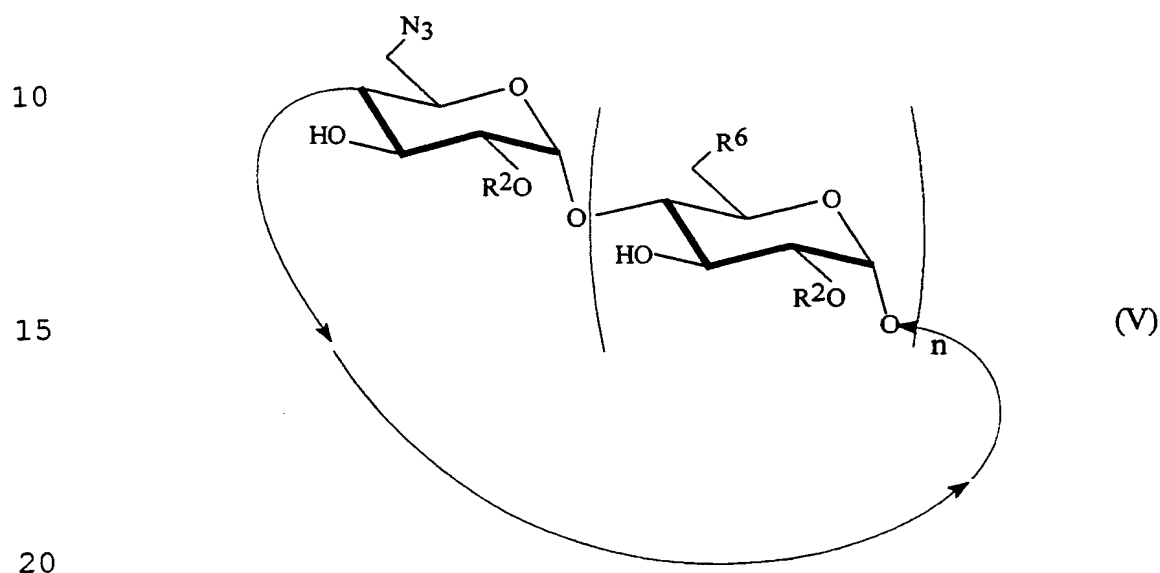
a) faire réagir un dérivé de formule :



dans laquelle tous les  $R^5$  représentent OH, ou l'un des  $R^5$  représente  $-N_3$  et les autres  $R^5$  représentent OH à

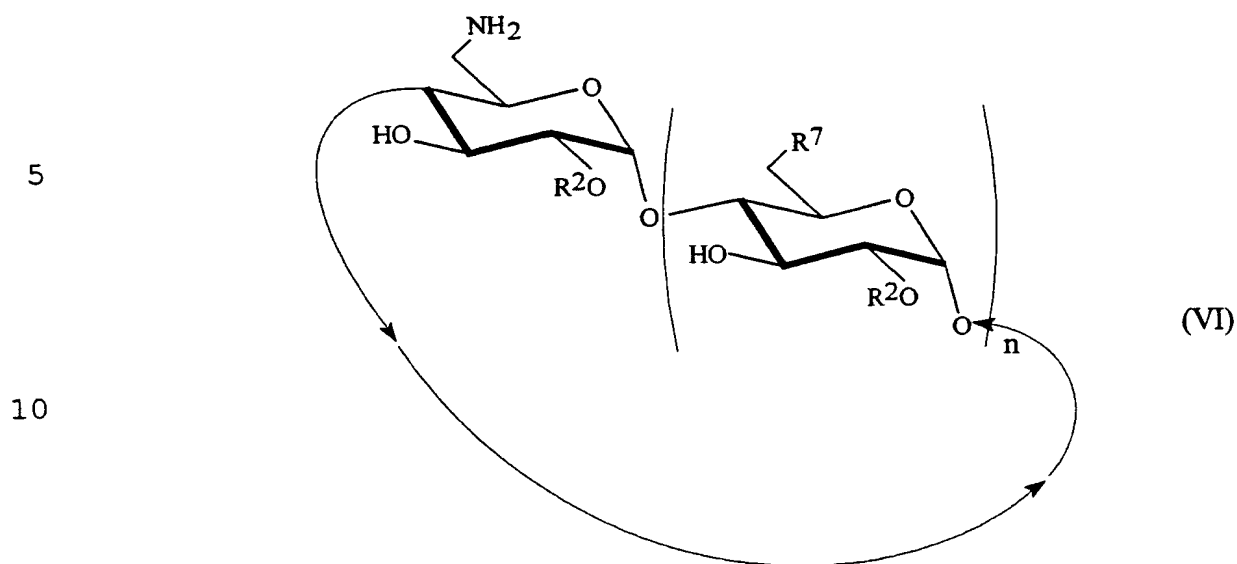
condition qu'il y ait au moins une unité glucose avec  $R^5$  représentant OH entre les deux unités glucose comportant le substituant  $N_3$ , et n est égal à 5, 6 ou 7,

- 5 avec un sulfate de dialkyle  $SO_4R^2_2$  avec  $R^2$  ayant la signification donnée ci-dessus, en milieu basique pour obtenir le dérivé de cyclodextrine de formule :



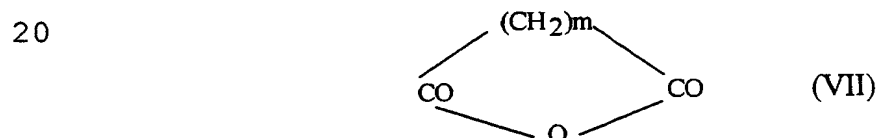
dans laquelle tous les  $R^6$  représentent  $OR^2$ , ou l'un des  $R^6$  représente  $N_3$  et les autres  $R^6$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$  et n sont tels que définis ci-dessus,

- 25 b) effectuer une réaction de Staudinger sur le dérivé de formule (V) à l'aide de triphénylphosphine et d'ammoniaque pour convertir  $N_3$  en  $NH_2$  et obtenir le dérivé de formule :



15 dans laquelle tous les  $R^7$  représentent  $OR^2$ , ou l'un des  $R^7$  représente  $NH_2$  et les autres  $R^7$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$  et  $n$  sont tels que définis ci-dessus,

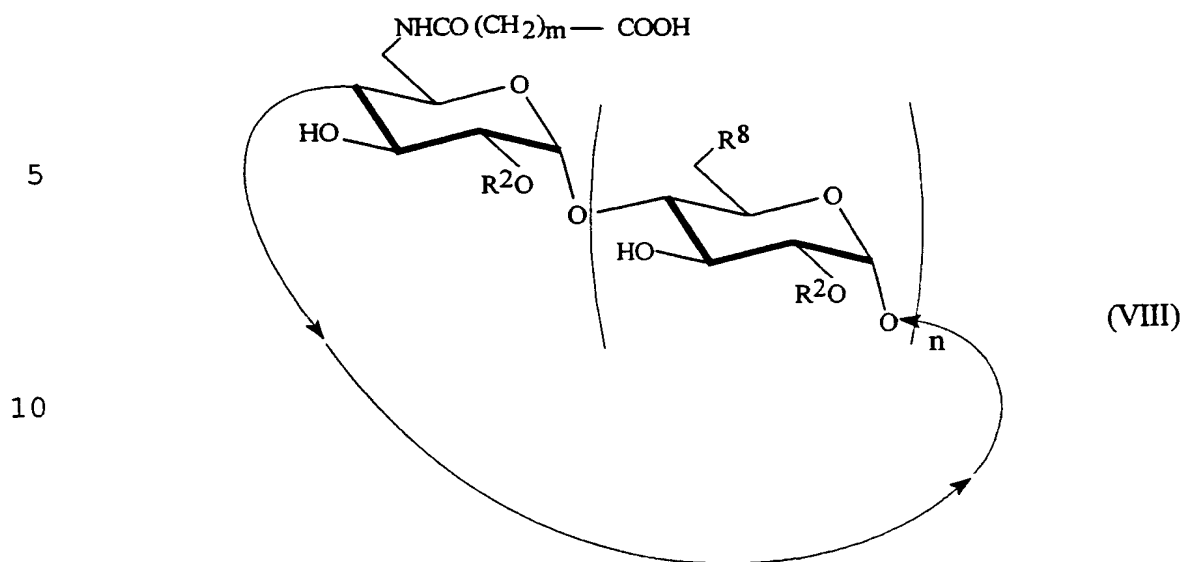
c) faire réagir le dérivé de formule (VI) avec un anhydride d'acide de formule :



où  $m$  est tel que défini ci-dessus, pour obtenir le

25 dérivé de formule :





15 dans laquelle tous les  $R^8$  représentent  $OR^2$  ou l'un des  $R^8$  représente  $-NHCO-(CH_2)_m-COOH$  et les autres  $R^8$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$ ,  $m$  et  $n$  sont tels que définis ci-dessus, et

20 d) faire réagir le dérivé de formule (VIII) avec un composé de formule  $NH_2-R^1$  pour obtenir le dérivé de cyclodextrine de formule (I) défini ci-dessus.

Les dérivés monoazido ou diazido utilisés comme produit de départ dans le procédé peuvent être obtenus à partir du dérivé de cyclodextrine correspondant monotosylé ou ditosylé par action

25 d'azoture de lithium dans l'eau.

Dans l'étape a) du procédé décrit ci-dessus, on fait réagir le dérivé de cyclodextrine de formule (IV) avec un sulfate de dialkyle  $SO_4R^2_2$  dans un

30 mélange de solvants organiques tels que le diméthylformamide (DMF) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) dans des proportions 50:50 en volume, en présence d'une

base telle que l'oxyde de baryum et l'hydroxyde de baryum, à 8°C. On peut séparer le dérivé de formule (V) ainsi obtenu en utilisant les procédés décrits en détails dans l'exemple 1.

5                    Dans l'étape b), on fait réagir le dérivé de formule (V) avec de la triphénylphosphine dans un solvant organique tel que le DMF puis on additionne de l'ammoniaque à 20%. Le dérivé de formule (VI) ainsi obtenu peut être purifié par évaporation du solvant,  
10 élimination par filtration du précipité blanc formé puis séparation par chromatographie échangeuse d'ions. Dans l'étape c), on fait réagir le dérivé de formule (VI) avec l'anhydride d'acide de formule (VII) voulu dans un solvant organique tel que le DMF. Le dérivé de  
15 formule (VIII) obtenu n'est pas isolé et l'étape d) suivante se fait directement dans le même milieu réactionnel. On additionne alors des réactifs de couplage peptidique tels que le *N,N'*-diisopropylcarbodiimide et l'hydroxybenzotriazole. Le  
20 dérivé de formule (VIII) réagit alors avec le composé de formule  $H_2N-R^1$  tel que la cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamine. On peut séparer le dérivé de formule I ainsi obtenu du milieu réactionnel par évaporation du solvant et purification par chromatographie sur colonne de gel de  
25 silice.

Dans le cas où l'on veut préparer un dérivé de formule (I) tel que défini ci-dessus, avec  $R^3$  représentant  $R^2$ , le procédé comprend les mêmes étapes que ci-dessus, mais dans l'étape a), on réalise une

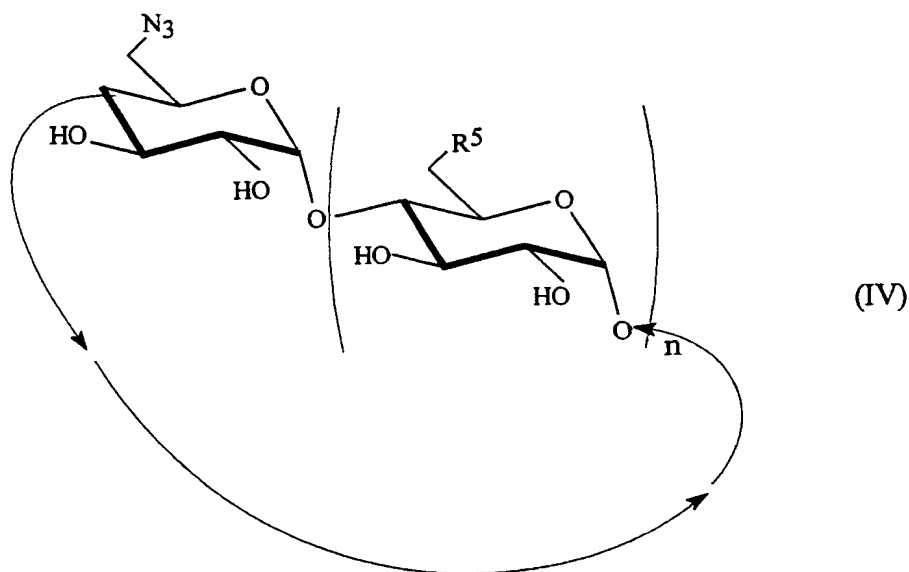
alkylation de tous les groupes OH par un iodoalcane.

Dans ce cas, on réalise les étapes suivantes :

a) faire réagir un dérivé de formule :

5

10

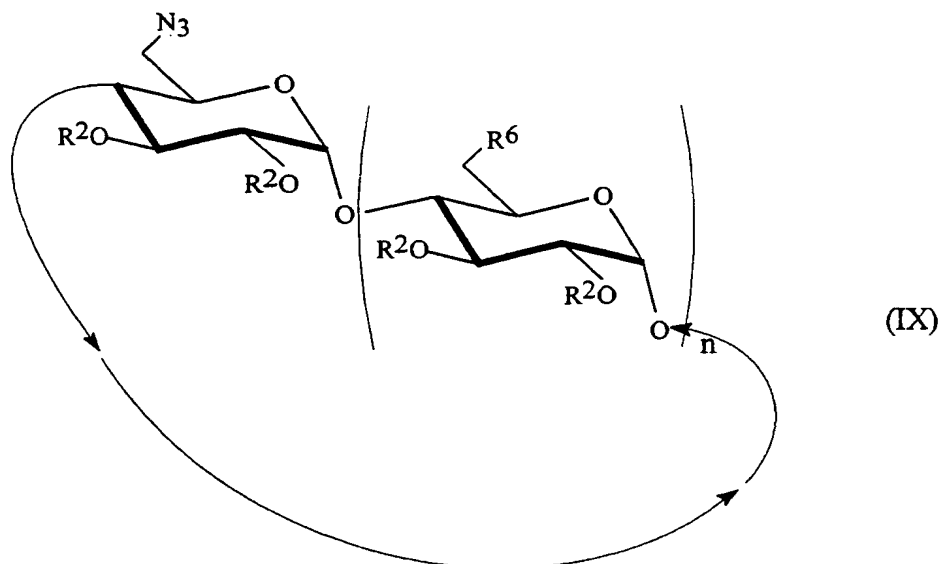


dans laquelle tous les  $R^5$  représentent OH, ou l'un des  $R^5$  représente  $-N_3$  et les autres  $R^5$  représentent OH à condition qu'il y ait au moins une unité glucose, avec  $R^5$  représentant OH entre les deux unités glucose comportant le substituant  $N_3$ , et  $n$  est égal à 5, 6 ou 7,

avec un iodoalcane de formule  $IR^2$  dans laquelle  $R^2$  a la signification donnée ci-dessus, en présence de NaH pour obtenir le dérivé de cyclodextrine de formule :

25

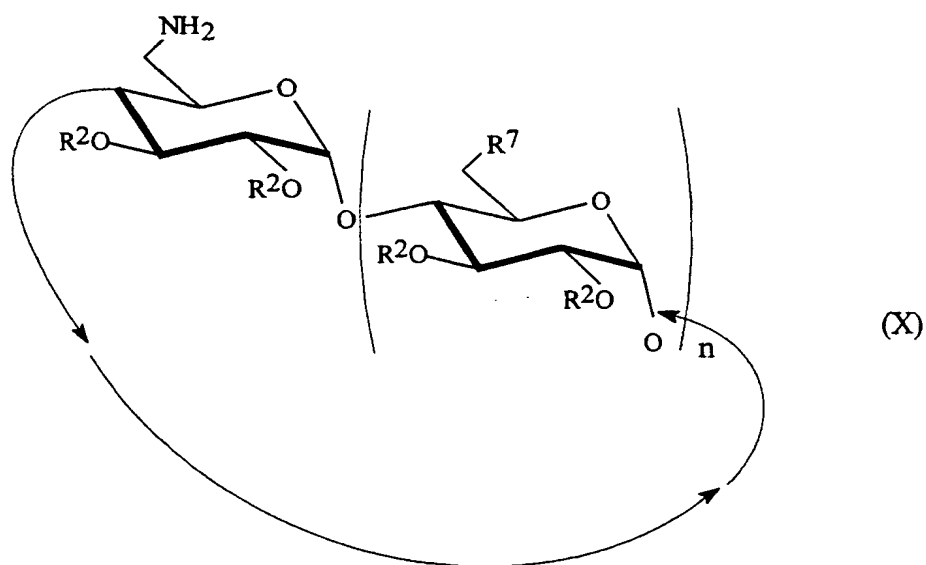
5



10 dans laquelle tous les  $R^6$  représentent  $OR^2$ , ou l'un des  $R^6$  représente  $N_3$  et les autres  $R^6$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$  et  $n$  sont tels que définis ci-dessus,

b) effectuer une réaction de Staudinger sur le dérivé de formule (IX) à l'aide de triphénylphosphine et d'ammoniaque pour convertir  $N_3$  en  $NH_2$  et obtenir le dérivé de formule :

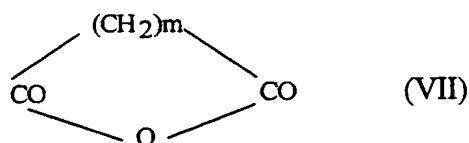
20



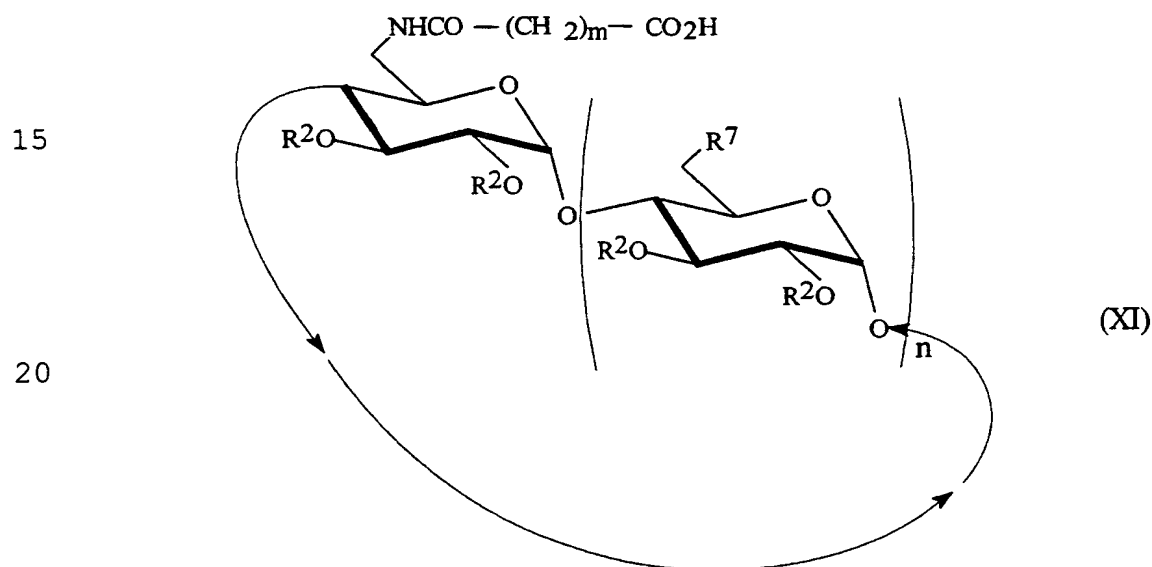
25

dans laquelle tous les  $R^7$  représentent  $OR^2$ , ou l'un des  $R^7$  représente  $NH_2$  et les autres  $R^7$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$  et  $n$  sont tels que définis ci-dessus,

c) faire réagir le dérivé de formule (X) avec  
5 un anhydride d'acide de formule :



10 où  $m$  est tel que défini ci-dessus, pour obtenir le  
dérivé de formule :



25 dans laquelle tous les  $R^7$  représentent  $OR^2$  ou l'un des  $R^7$  représente  $-NHCO-(CH_2)_m-COOH$  et les autres  $R^7$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$ ,  $m$  et  $n$  sont tels que définis ci-dessus, et

30 d) faire réagir le dérivé de formule (XI) avec un composé de formule  $\text{NH}_2\text{-R}^1$  pour obtenir le dérivé de cyclodextrine de formule (I) défini ci-dessus.

L'invention a encore pour objet les complexes d'inclusion du dérivé de cyclodextrine de formule (I) avec un composé hydrophobe en vue de solubiliser ce composé hydrophobe dans un milieu aqueux. Les composés chimiques hydrophobes susceptibles d'être solubilisés dans des milieux aqueux au moyen de ces dérivés de cyclodextrine (I) peuvent être de différents types. A titre d'exemple de tels composés, on peut citer des produits cosmétiques, des vitamines, des molécules pharmaceutiquement actives et des molécules utilisées comme agents de contraste pour l'imagerie médicale, par exemple, les composés décrits par Uekama et Irie dans Chemical Review (1998), 98, pp. 2045-2076 [7].

De préférence dans l'invention, le composé chimique hydrophobe est une molécule pharmaceutiquement active. A titre d'exemples de telles molécules, on peut citer les stéroïdes, par exemple la prednisolone, les neurotropes comme la dothiépine, les bactériostatiques comme le chloramphénicol, les vitamines comme la vitamine A, des toniques de la paroi vasculaire comme l'esculine, et des agents de contraste pour l'imagerie médicale comme l'acide 16-iodo-3-méthylhexadécanoïque.

Ces complexes d'inclusion peuvent être préparés par des procédés classiques, par exemple en ajoutant à une solution ou à une suspension de la cyclodextrine de formule (I) utilisée, une solution du composé hydrophobe dans un solvant organique approprié, par exemple l'acétone.

Les dérivés de cyclodextrine de formule (I) ont la propriété de s'auto-organiser spontanément en milieu aqueux pour donner des nanoparticules de 25 à 30 Å de rayon moyen et de forme parfaitement sphérique.

5 Le nombre moyen de monomères est de 24 molécules de dérivés de cyclodextrine par nanoparticule. Aussi l'invention a également pour objet une solution aqueuse de nanoparticules d'un dérivé de cyclodextrine de formule (I) seul ou sous forme de complexe d'inclusion

10 avec un composé hydrophobe.

Cette solution de nanoparticules peut être préparée en formant une solution aqueuse du dérivé de cyclodextrine ou d'un complexe d'inclusion de ce dérivé ayant une concentration en dérivé ou complexe

15 supérieure à la concentration micellaire critique du dérivé.

L'auto-organisation des cyclodextrines amphiphiles en nanoparticules dans un milieu aqueux, permet d'assurer le transport d'une molécule

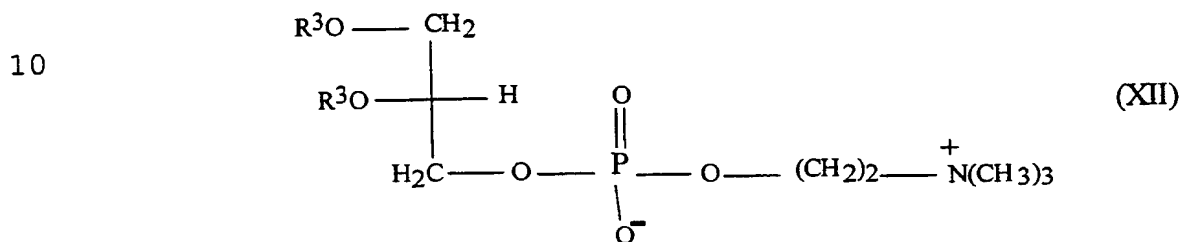
20 hydrophobe, par exemple un principe actif, en particulier par voie transmembranaire ou parentérale.

Les dérivés de cyclodextrines de l'invention sont de plus particulièrement intéressants car ils peuvent être incorporés dans des systèmes

25 organisés de tensioactifs tels que des petites vésicules de phospholipide ou des micelles. Cette incorporation est destinée à permettre la solubilisation de systèmes organisés, en vue d'assurer le transport de principes actifs inclus dans le dérivé

30 de cyclodextrine.

Aussi, l'invention a aussi pour objet un système de tensioactifs organisé comprenant un dérivé de cyclodextrine ou un complexe d'inclusion de ce dérivé conformes à l'invention. Les tensioactifs  
 5 susceptibles de former de tels systèmes organisés peuvent être de différents types. A titre d'exemple, on peut citer les phospholipides répondant à la formule générale suivante :



dans laquelle  $\text{R}^3$  représente  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_p - \text{CO}$  avec  $p$  étant un nombre entier allant de 6 à 18. Ces phospholipides  
 15 sont capables de former de petites vésicules unilamellaires. C'est le cas en particulier de la dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) qui répond à la formule ci-dessus avec  $p = 12$ .

Pour incorporer le dérivé de cyclodextrine  
 20 ou un complexe d'inclusion de ce dérivé conformes à l'invention dans le système organisé de tensioactifs, on peut préalablement former des petites vésicules de DMPC par sonication puis ajouter dans la solution aqueuse le dérivé de cyclodextrine ou le complexe  
 25 d'inclusion. Le système mixte ainsi obtenu devient alors parfaitement soluble dans l'eau conduisant à une solution limpide. Le système mixte obtenu dans ce cas précis est une micelle mixte d'un rayon moyen de 60 Å.



Aussi l'invention a aussi pour objet une solution aqueuse comprenant en solution un système mixte formé à partir de vésicules de phospholipides ou de protéines membranaires, et d'au moins un dérivé de cyclodextrine ou d'au moins un complexe d'inclusion de dérivé de cyclodextrine conformes à l'invention.

De telles solutions sont intéressantes car elles permettent d'assurer le transport de molécules hydrophobes, par exemple d'un principe actif par voie transmembranaire ou parentérale, pour des applications pharmaceutiques et cosmétiques.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en référence aux figures 1 à 5 annexées.

#### **Brève description des dessins**

La figure 1 illustre le spectre de diffusion de neutrons expérimental, en échelle logarithmique, d'une solution aqueuse de nanoparticules du dérivé de cyclodextrine obtenu dans l'exemple 1 avec trois courbes théoriques de diffusion de micelles sphériques, de micelles cylindriques et de bicouches.

La figure 2 illustre l'aspect de différents mélanges de cyclodextrine et de phospholipide.

Les figures 3, 4 et 5 illustrent respectivement les spectres de résonance magnétique nucléaire du  $^{31}\text{P}$  obtenus à partir de l'échantillon a (figure 3), b (figure 5) et d (figure 4) de l'exemple 3.

5 La figure 6 illustre le spectre de diffusion de neutrons expérimental, en échelle logarithmique, d'un mélange DMPC/dérivé de cyclodextrine (échantillon d) obtenu dans l'exemple 3 avec trois courbes théoriques de diffusion de  
10 micelles sphériques, de micelles cylindriques et de bicouches.

La figure 7 illustre les spectres de diffusion de neutrons expérimentaux en échelle logarithmique de mélanges d'acide 16-iodo-3-  
15 méthylhexadécanoïque et du dérivé de cyclodextrine de l'exemple 1 (1/1 et 0,5/1 mol) ainsi que le spectre de diffusion de neutron du dérivé de cyclodextrine de l'exemple 1 seul avec la courbe de diffusion théorique de nanoparticules seules.

## 20 Exposé détaillé des modes de réalisation.

**Exemple 1: Synthèse du mono-6-(cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',  
2''''',2''''', 6',6'',6''',6''''',6''''',6''''''-**

25 **tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose.**

Ce composé est le dérivé de formule (I) avec  $R^1$  représentant le groupe de formule (III),  $R^2$  étant le groupe méthyle,  $R^3$  représentant H, tous les  $R^4$  représentant  $\text{OCH}_3$ , m étant égal à 2 et n étant égal à

a) Préparation du mono-6-azido-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''''',2''''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6'''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose.

Dans un ballon, on dissout 2 g (1,7 mmol) de mono-6-azido-6-desoxy-cyclomaltoheptaose (obtenu par exemple selon le protocole décrit dans Tetrahedron Lett. (1993), 34, pp. 2457-2460 [8] et J. Chem. Soc. Perkin Trans 2 (1995), pp. 723-730 [9]) dans 15 mL de diméthylsulfoxyde anhydre. Cette solution est additionnée de 15 mL de diméthylformamide (DMF) anhydre. On ajoute ensuite sous atmosphère d'azote et sous vive agitation, 3,8 g (~12 mmol) d'hydroxyde de baryum octahydraté et 3,6 g (~24 mmol) d'oxyde de baryum. Après homogénéisation du milieu, on ajoute 8 mL de sulfate de diméthyle (~84 mmol), et on laisse sous vive agitation, sous atmosphère d'azote, pendant 30 heures à 8 °C. La suspension d'un aspect laiteux est ensuite additionnée de 5 mL d'ammoniaque à 20 % et agitée pendant 3 heures à température ambiante. On laisse décanter au réfrigérateur pendant une nuit. Après concentration du surnageant sous pression réduite, le solide résiduel est repris avec 100 mL de dichlorométhane, et encore deux fois avec 50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées 3 fois avec 20 mL d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, 2 fois avec 20 mL d'eau, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées sous pression réduite. Le produit est précipité par addition de 100 mL de n-hexane, filtré, lavé avec 100 mL de n-hexane et séché sous vide.

On recueille 0,80 g (0,60 mmol) de mono-6-azido-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose qui se présente sous la forme d'une poudre blanche.

b) Préparation du mono-6-amino-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose.

On dissout 0,75 g (0,56 mmol) du composé obtenu en a) dans 30 mL de DMF. A cette solution, on ajoute goutte à goutte et sous agitation à température ambiante 0,75 g (2,86 mmol) de triphénylphosphine dans 5 mL de DMF. Le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante pendant 2 heures, refroidi à 0°C et traité par 14 mL d'ammoniaque à 20 %. On laisse 18 heures à température ambiante sous agitation, puis le solvant est éliminé sous pression réduite et le solide résiduel est repris avec 30 mL d'eau. L'abondant insoluble de triphénylphosphine et de l'oxyde correspondant est éliminé par filtration. La solution est concentrée sous vide et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions (résine Lewatit SP 1080 sous forme H<sup>+</sup>). On recueille 0,35 g (0,27 mmol) de mono-6-amino-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose qui se présente sous la forme d'une poudre blanche.

c) Préparation du mono-6-(cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose.

5 A une solution de 0,25 g (0,19 mmol) du composé obtenu en b) dans 6 mL de DMF anhydre, on ajoute sous atmosphère d'azote et sous agitation à température ambiante 0,019 g (0,19 mmol) d'anhydride succinique dans 2 mL de DMF anhydre. Le milieu  
10 réactionnel est maintenu à température ambiante pendant 5 heures, puis additionné de 0,11 mL (0,76 mmol) de N,N'-diisopropylcarbodiimide et de 0,028 g (0,19 mmol) d'hydroxybenzotriazole dans 2 mL de DMF anhydre. Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, on  
15 ajoute 0,089 g (0,23 mmol) de cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamine (obtenu en deux étapes à partir du cholest-5-èn-3 $\beta$ -ol selon les protocoles décrits dans Tetrahedron Lett. (1977), pp. 1977-1980 [10]. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 48  
20 heures, hydrolysé par addition de 0,30 mL d'eau et concentré sous pression réduite. Le solide résiduel est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (gel de silice 60 Fluka; éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5 puis 9:1 (v/v)). On recueille 0,24 g de mono-6-  
25 (cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose.

(71 % de rendement en composé pur final à partir du mono-6-amino-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',

2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6''''''-  
tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose).

Les caractéristiques de ce composé sont les suivantes :

- 5 - Chromatographie sur couches minces (Plaques de Silice Merck)  $R_f = 0,50$  dans le mélange  $CH_2Cl_2$ -MeOH 9:1 (v/v), révélation par  $H_2SO_4$  10 %.
- Spectrométrie de masse: ESI-MS :  $m/z = 1805,95$   
[M+Na]<sup>+</sup> pour  $C_{86} H_{146} N_2 O_{36} Na$ .
- 10 - RMN  $^1H$  (500 MHz, 25°C, solution 7 mM dans  $CDCl_3$ ) : attribution par des expériences COSY et COSY relais :  
 $\delta = 6,49$  (NH CD), 5,70 (NH Chol), 5,38 (H-6 Chol), 5,28-4,88 (H-1, OH-3 CD), 4,11 (H-3 Chol), 3,99-3,16 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', OCH<sub>3</sub> CD), 2,60-2,48 (CH<sub>2</sub> succ, H-4 Chol), 2,04-0,68 (H Chol).
- 15

**Exemple 2: Préparation de nanoparticules de mono-6-(cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-désoxy-**

2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6'  
20 ''''',6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose.

On prépare des nanoparticules de mono-6-(cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-désoxy-2,2',  
2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',  
6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose simplement  
25 en formant une solution aqueuse de cette cholestérylcyclodextrine à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique (cmc).

La cmc de la cyclodextrine de l'exemple 1 a été déterminée par des mesures de tension de surface. La valeur de la cmc est de  $9.10^{-6}$  mol/L.

Le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules a été mesuré par diffusion quasi-élastique de la lumière. La valeur du diamètre moyen (DM) calculée selon l'approximation de Stokes-Einstein basée sur le modèle des sphères parfaites sans interactions est de 0,6 nm (60 Å). L'analyse par diffusion statique de la lumière de solutions aqueuses de nanoparticules à différentes concentrations ( $2,5.10^{-3}$ ,  $5.10^{-3}$  et  $10^{-2}$  mol/L) donne une masse moyenne des agrégats de 43000 g/mol, ce qui correspond à 24 monomères en moyenne par nanoparticule.

La forme parfaitement sphérique ainsi que la taille des nanoparticules ont été confirmées par diffusion de neutrons. Le spectre de diffusion obtenu à partir d'une solution  $10^{-2}$  mol/l dans  $D_2O$  du dérivé de cyclodextrine de l'exemple 1 est représenté sur la figure 1 (spectre 1).

Sur la figure 1, on a également représenté les spectres théoriques simulant des sphères (spectre 2), des cylindres (spectre 3) ou des lamelles (spectre 4) formés à partir du dérivé de cyclodextrine de l'exemple 1, à une concentration de  $10^{-2}$  mol/L dans  $D_2O$ . La superposition du spectre 2 simulant les sphères avec le spectre expérimental 1 prouve la forme sphérique des agrégats de cholestéryl-cyclodextrine. Ces agrégats sont tapissés à la surface de cavités de cyclodextrines disponibles pour l'inclusion de molécules actives hydrophobes, le cœur étant constitué des groupements

cholestérol. Le spectre théorique simulant les sphères donne un diamètre moyen de 0,5 nm (50 Å) et un nombre moyen de monomères par nanoparticule de 24.

5 **Exemple 3: Préparation des systèmes mixtes de mono-6-(cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-désoxy-2,2', 2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''', 6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose et de Di-Myristoyl-Phosphatidyl-Choline (DMPC).**

10 On prépare une suspension aqueuse à  $15.10^{-3}$  mol/L de DMPC soit sous la forme de vésicules multilamellaires de grande taille (MLVs), soit sous la forme de vésicules unilamellaires de petite taille (SUVs), en suivant les protocoles de préparation  
15 décrits par exemple dans "Liposomes: a practical approach", R.R.C. New Ed., IRL Press, Oxford University Press, 1990 [11]. On ajoute à la suspension de MLVs ou de SUVs de DMPC la cyclodextrine de l'exemple 1 de façon à ce que la concentration finale de la  
20 cyclodextrine dans le mélange aqueux cyclodextrine/DMPC soit de  $0,5.10^{-3}$  ou  $2,5.10^{-3}$  mol/L.

La figure 2 illustre l'aspect des différents mélanges après 12 h à 25°C. Dans le tube a, il s'agit d'une suspension aqueuse de vésicules  
25 unilamellaires de DMPC 15 mM. Les tubes c et d correspondent aux mélanges DMPC/cyclodextrine :  $15.10^{-3}/0,5.10^{-3}$  et  $15.10^{-3}/2,5.10^{-3}$  mol/L respectivement. Le tube b est un tube "témoin" correspondant au mélange DMPC/heptakis(2,6-di-O-méthyl)cyclomaltoheptaose  $15.10^{-3}/2,5.10^{-3}$  mol/L, soit  
30



un mélange de DMPC avec une cyclodextrine ne comportant pas de substituant stéroïde.

Les différents mélanges sont examinés par spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  à 81 MHz.

5                    La figure 3 représente le spectre correspondant au tube a (DMPC seule).

La figure 4 représente le spectre correspondant au tube d (mélange DMPC/cyclodextrine ;  $15.10^{-3}/2,5.10^{-3}$  mol/L).

10                    La figure 5 représente le spectre correspondant au tube b (mélange DMPC/cyclodextrine de l'art antérieur).

L'existence de petites vésicules unilamellaires de DMPC dans le tube a est confirmée sur  
15 le spectre de la figure 3, par la présence des deux pics très fins vers 0 ppm correspondant aux phosphores situés à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules.

Le spectre de la figure 4 qui correspond à l'échantillon d, parfaitement transparent, se réduit à  
20 une seul pic fin centré à 0 ppm, indiquant la présence d'agrégats plus petits que les vésicules unilamellaires du tube a. Le spectre correspondant au tube "témoin" b indique la formation de vésicules plus grandes que les vésicules de départ. Il n'y a pas de réorganisation du  
25 milieu avec cette cyclodextrine.

Dans le tube c, la quantité de cyclodextrine de l'invention est trop faible par rapport à la quantité de DMPC pour conduire à une

solution transparente comme dans le tube d. On obtient un mélange biphasique.

Le diamètre hydrodynamique moyen des agrégats mixtes de l'échantillon d a été mesuré par  
5 diffusion quasi-élastique de la lumière. La valeur du diamètre moyen (DM) calculée selon l'approximation de Stokes-Einstein basée sur le modèle des sphères parfaites sans interactions est de 13 nm (130 Å).

On examine ensuite l'échantillon d par  
10 diffusion de neutrons.

La figure 6 illustre le spectre de diffusion obtenu (spectre 5). Sur la figure 6, on a également représenté les spectres théoriques simulant des sphères (spectre 6), des cylindres (spectre 7) ou  
15 des lamelles (spectre 8) formés à partir du mélange DMPC/cyclodextrine de l'exemple 1 avec le rapport  $15.10^{-3}/2,5.10^{-3}$  mol/L dans  $D_2O$ . La superposition du spectre 6 simulant des sphères avec le spectre expérimental 5 prouve la forme sphérique des agrégats  
20 mixtes DMPC/cyclodextrine de l'exemple 1. Ces systèmes sphériques mixtes présentent à la surface des cavités de cyclodextrines susceptibles d'inclure des molécules actives hydrophobes. Le spectre théorique simulant les sphères donne un diamètre moyen de 10,8 nm (108 Å).

**Exemple 4: Préparation de complexes d'inclusion du composé mono-6-(cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose avec diverses molécules actives hydrophobes.**

A une solution aqueuse de nanoparticules de mono-6-(cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose obtenue comme dans l'exemple 2, on ajoute simplement le composé hydrophobe soit directement, soit en solution dans un solvant organique approprié, par exemple l'acétone, qu'on laisse évaporer lentement à l'air libre.

Différentes molécules actives hydrophobes ont été testées et se sont révélées capables de former des complexes d'inclusion avec la cyclodextrine de l'exemple 1. Ainsi, on a solubilisé en milieu aqueux par formation d'un complexe d'inclusion l'acide 16-iodo-3-méthylhexadécanoïque, un acide gras utilisé comme agent de contraste pour l'imagerie médicale qui avait déjà pu être solubilisé dans des cyclodextrines, comme il est décrit dans FR-A-2 726 765 [12].

La figure 7 représente les spectres de diffusion de neutrons obtenus avec :

- la solution de nanoparticules de cyclodextrine de l'exemple 1 et l'acide gras ( 1 : 0,5 éq. mol) (spectre 9) ;

- la solution de nanoparticules de cyclodextrine de l'exemple 1 et l'acide gras (1 : 1 éq. mol) (spectre 10) ; et

- la solution de nanoparticules de cyclodextrine  
5 seule (spectre 11).

Sur cette figure, on a également représenté le spectre théorique (Spectre 12) simulant les sphères.

Sur cette figure, on voit que l'incorporation des molécules d'acide gras dans les  
10 nanoparticules de la cyclodextrine de l'exemple 1 entraîne des modifications nettes au niveau des spectres de diffusion. L'intensité  $I(q)$  se trouve augmentée. L'intensité  $I(q)$  est proportionnelle au volume des nanoparticules. La présence de molécules  
15 supplémentaires (molécules d'acide gras) dans les nanoparticules a pour effet d'augmenter la valeur du contraste et donc de l'intensité.

L'incorporation dans les nanoparticules de mono-6-(cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-desoxy-  
20 2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6'  
'''',6''''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose des composés hydrophobes suivants :

- la dothiépine (neurotrope),
  - le chloramphénicol (bactériostatique),
  - 25 - la vitamine A, et
  - l'esculine (tonique de la paroi vasculaire),
- a également été mise en évidence par diffusion de neutrons.

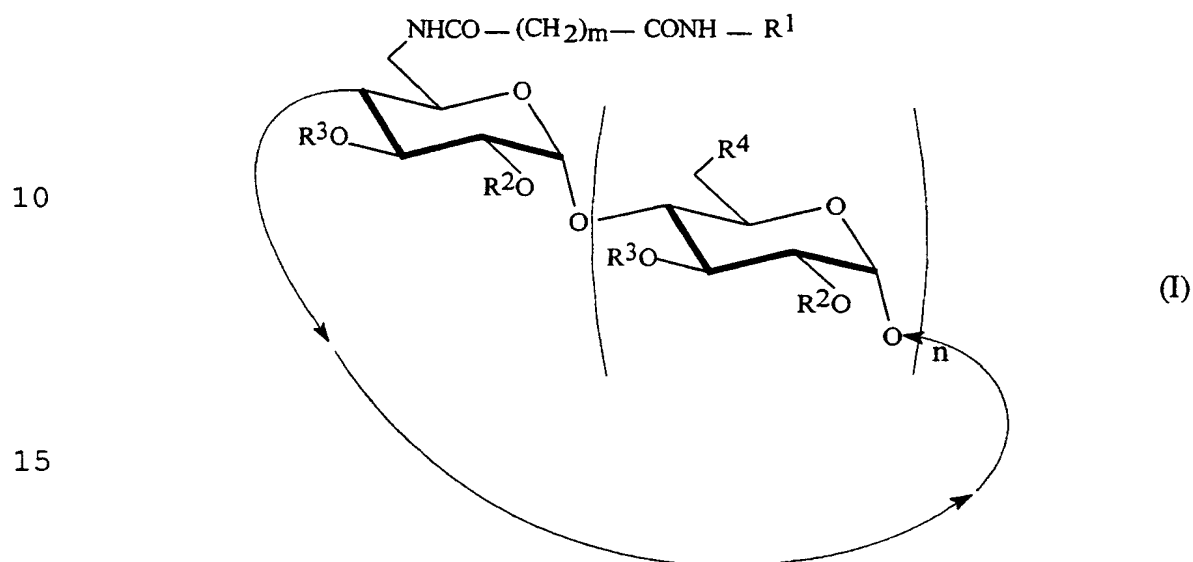
## Références citées.

- 5 [1] : D. Duchêne "Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins » paru dans « Cyclodextrins and their industrial uses", Editions de Santé, Paris 1987, pp. 213-257.
- [2] : A. Yabe et coll, Thin Solid Films, (1988), 160, pp. 33-41.
- 10 [3] : L. Jullien et coll, « J. Chem. Soc. Perkin Trans 2, 1993, pp. 1011-1022.
- 15 [4] : A. Gulik et coll dans Langmuir (1998), 14, pp. 1050-1057.
- [5] : FR-A-2 736 056.
- 20 [6] : J. Chem. Soc. Perkin Trans 2, (1998), pp. 2638-2646.
- [7] : Uekama et Irie dans Chemical Review (1998), 98, pp. 2045-2076.
- 25 [8] : Tetrahedron Lett. (1993), 34, pp 2457-2460.
- [9] : J. Chem. Soc. Perkin Trans 2 (1995), pp 723-730.
- [10] : Tetrahedron Lett. (1977), pp. 1977-1980.
- 30 [11] : "Liposomes: a practical approach", R.R.C. New Ed., IRL Press, Oxford University Press, 1990).
- [12] : FR-A-2 726 765.

## REVENDICATIONS

1. Dérivé amphiphile de cyclodextrine répondant à la formule :

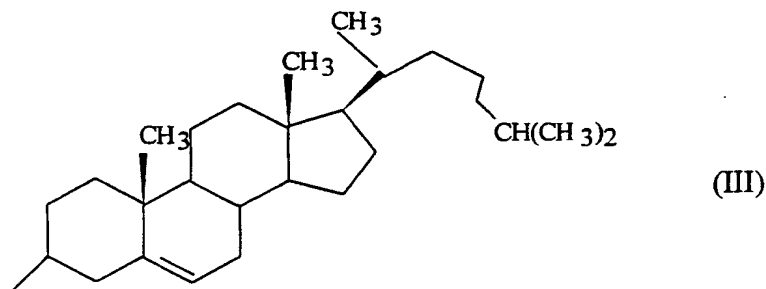
5



dans laquelle :

- $R^1$  représente un groupe dérivé d'un stéroïde,
- 20 -  $R^2$  représente un groupe alkyle ou aryle éventuellement substitué,
- $R^3$  représente H ou  $R^2$ ,
- tous les  $R^4$  représentent  $OR^2$ , ou
- l'un des  $R^4$  représente  $-NHCO(CH_2)_mCONHR^1$  et les autres
- 25  $R^4$  représentent  $OR^2$  à condition qu'il y ait au moins une unité glucose avec  $R^4$  représentant  $OR^2$  entre les deux unités glucose comportant le substituant  $-NHCO(CH_2)_mCONHR^1$ ,
- m est un nombre entier allant de 1 à 8, et
- 30 - n est égal à 5, 6 ou 7.

2. Dérivé de cyclodextrine selon la revendication 1 dans lequel  $R^1$  représente le groupe de formule :



10

3. Dérivé de cyclodextrine selon la revendication 1 ou 2, dans lequel tous les  $R^4$  représentent  $OR^2$ .

15

4. Dérivé de cyclodextrine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel  $R^2$  représente le groupe méthyle et  $R^3$  représente un atome d'hydrogène.

5. Dérivé de cyclodextrine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel n est égal à 6.

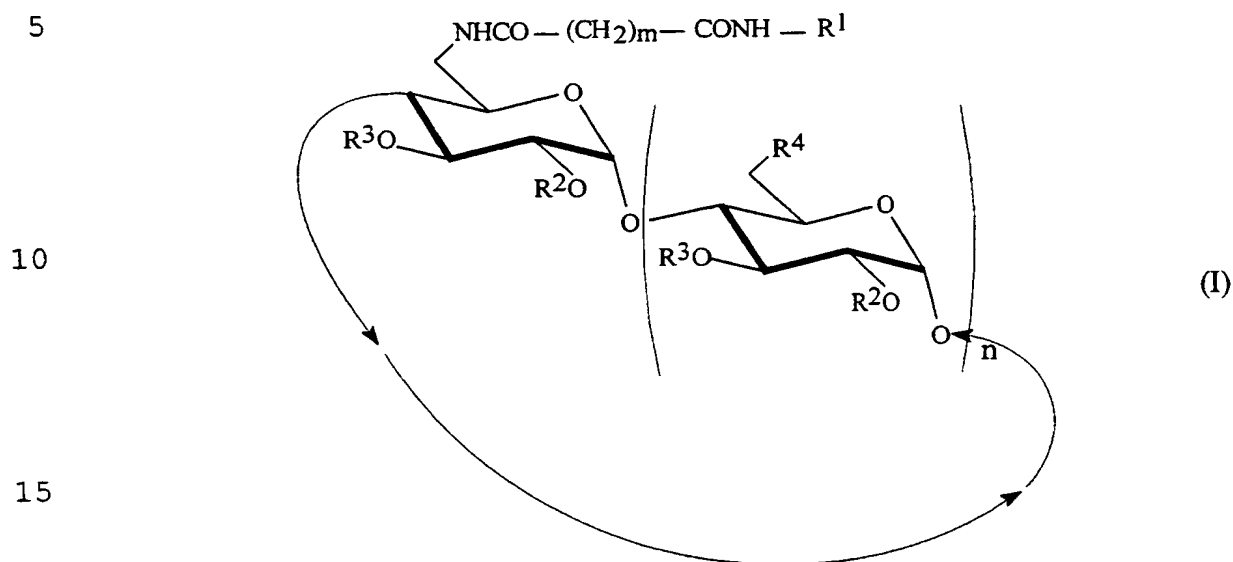
6. Dérivé de cyclodextrine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel m est égal 2.

25

7. Mono-6-(cholest-5-èn-3 $\alpha$ -ylamido)succinylamido-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''',6''''',6'''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose.

30

8. Procédé de préparation d'un dérivé de cyclodextrine de formule :



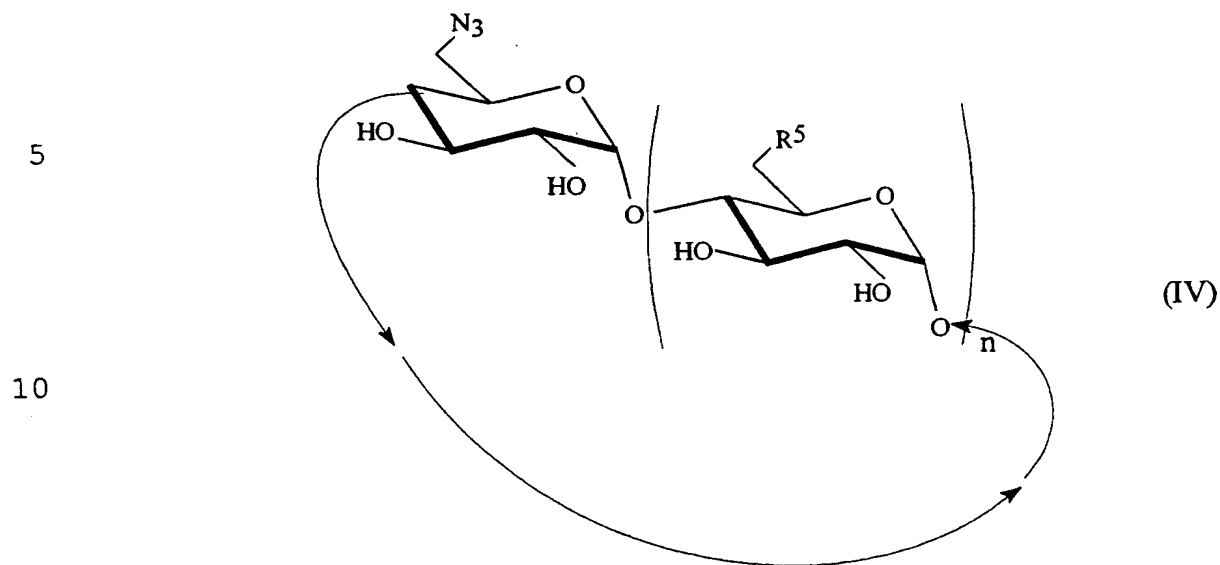
dans laquelle :

- $R^1$  représente un groupe dérivé d'un stéroïde,
  - 20 -  $R^2$  représente un groupe alkyle ou aryle éventuellement substitué,
  - $R^3$  représente H,
  - tous les  $R^4$  représentent  $OR^2$ , ou
  - l'un des  $R^4$  représente  $-NHCO(CH_2)_mCONHR^1$  et les autres
  - 25  $R^4$  représentent  $OR^2$  à condition qu'il y ait au moins une unité glucose avec  $R^4$  représentant  $OR^2$  entre les deux unités glucose comportant le substituant  $-NHCO-(CH_2)_m-CONH-R^1$ ,
  - $m$  est un nombre entier allant de 1 à 8, et
  - 30 -  $n$  est égal à 5, 6 ou 7,
- qui comprend les étapes suivantes :



35

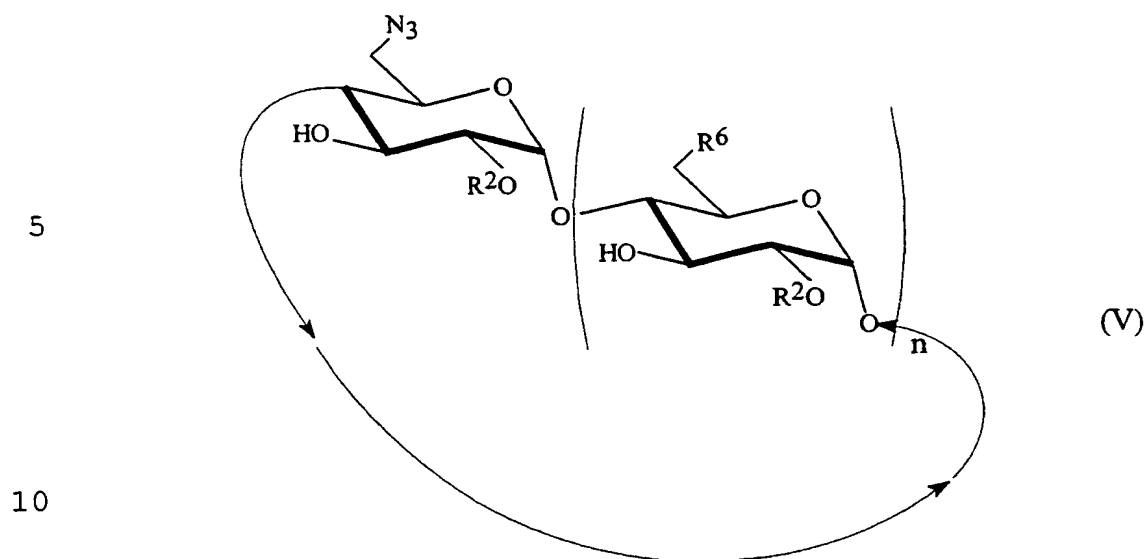
a) faire réagir un dérivé de formule :



dans laquelle tous les  $R^5$  représentent OH, ou l'un des  $R^5$  représente  $-N_3$  et les autres  $R^5$  représentent OH à condition qu'il y ait au moins une unité glucose avec  $R^5$  représentant OH entre les deux unités glucose comportant le substituant  $N_3$ , et n est égal à 5, 6 ou 7,

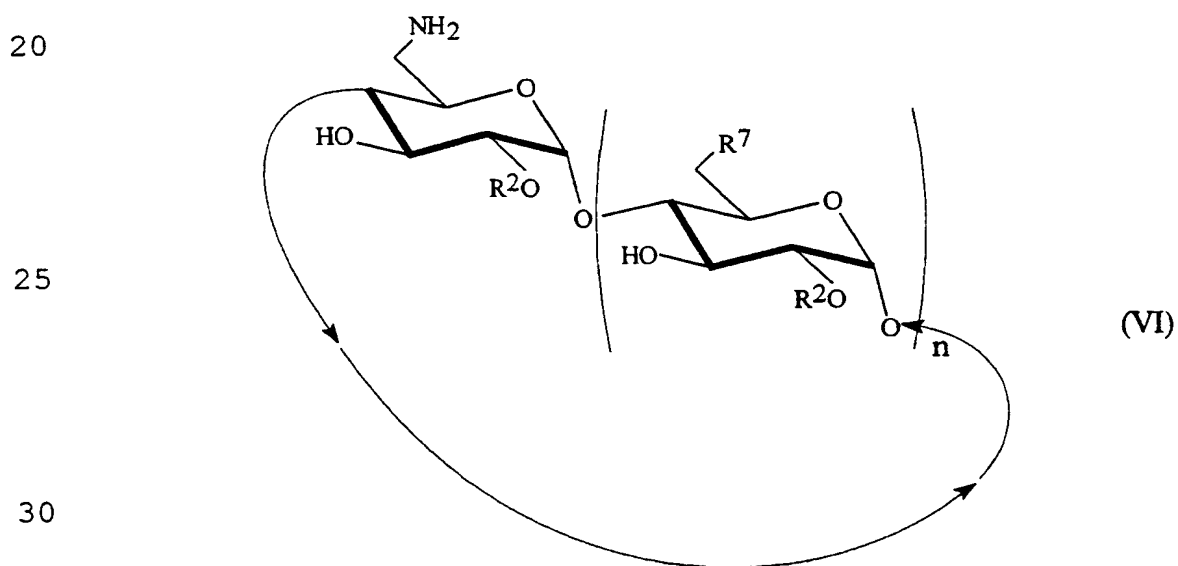
avec un sulfate de dialkyle  $SO_4R^2_2$  avec  $R^2$  ayant la signification donnée ci-dessus, en milieu basique pour obtenir le dérivé de cyclodextrine de formule :

30



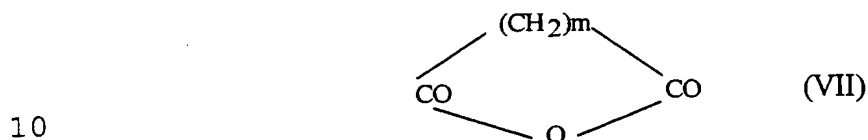
dans laquelle tous les  $R^6$  représentent  $OR^2$ , ou l'un des  $R^6$  représente  $N_3$  et les autres  $R^6$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$  et  $n$  sont tels que définis ci-dessus,

b) effectuer une réaction de Staudinger sur le dérivé de formule (V) à l'aide de triphénylphosphine et d'ammoniaque pour convertir  $N_3$  en  $NH_2$  et obtenir le dérivé de formule :

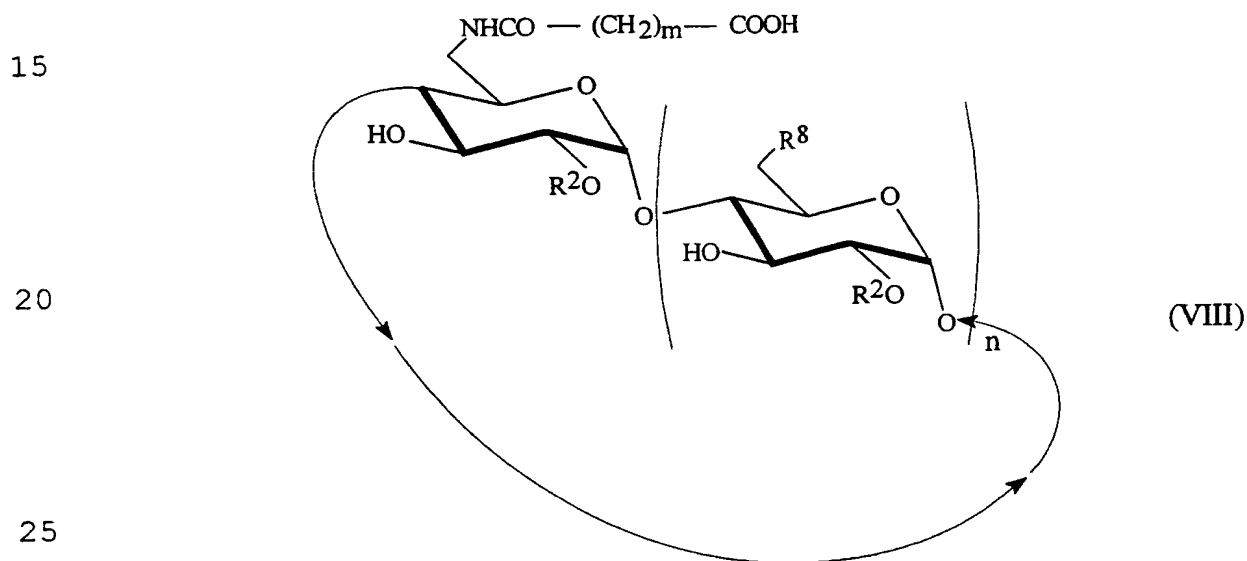


dans laquelle tous les  $R^7$  représentent  $OR^2$ , ou l'un des  $R^7$  représente  $NH_2$  et les autres  $R^7$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$  et  $n$  sont tels que définis ci-dessus,

c) faire réagir le dérivé de formule (VI) avec  
5 un anhydride d'acide de formule :



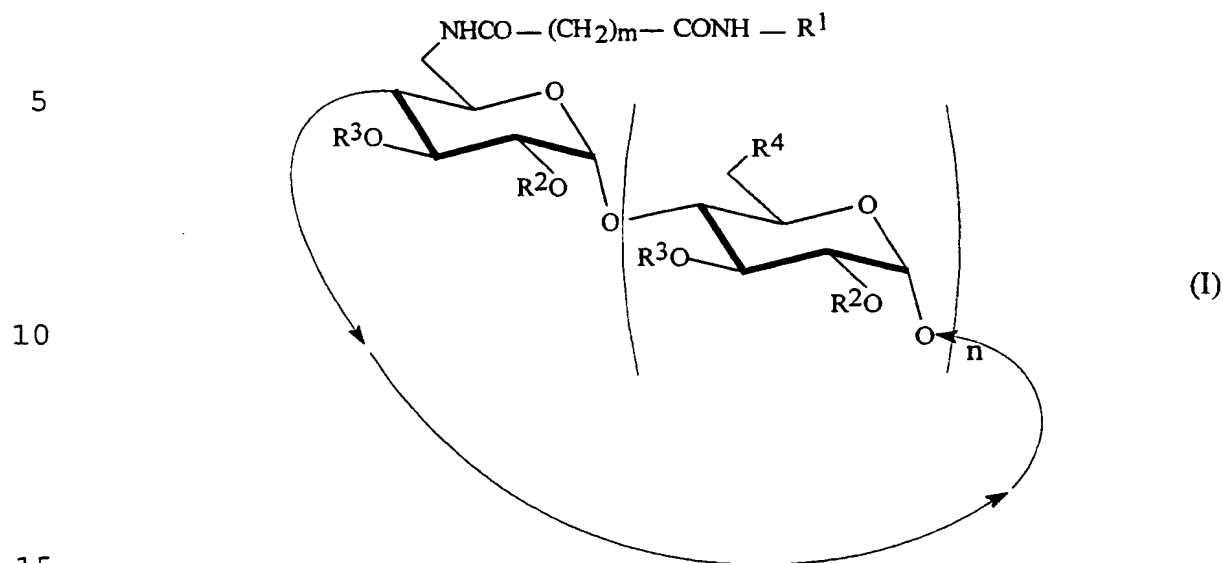
où  $m$  est tel que défini ci-dessus, pour obtenir le dérivé de formule :



dans laquelle tous les  $R^8$  représentent  $OR^2$  ou l'un des  $R^8$  représente  $-NHCO-(CH_2)_m-COOH$  et les autres  $R^8$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$ ,  $m$  et  $n$  sont tels que définis  
30 ci-dessus, et

d) faire réagir le dérivé de formule (VIII) avec un composé de formule  $NH_2-R^1$  pour obtenir le dérivé de cyclodextrine de formule (I) défini ci-dessus.

9. Procédé de préparation d'un dérivé de cyclodextrine de formule :

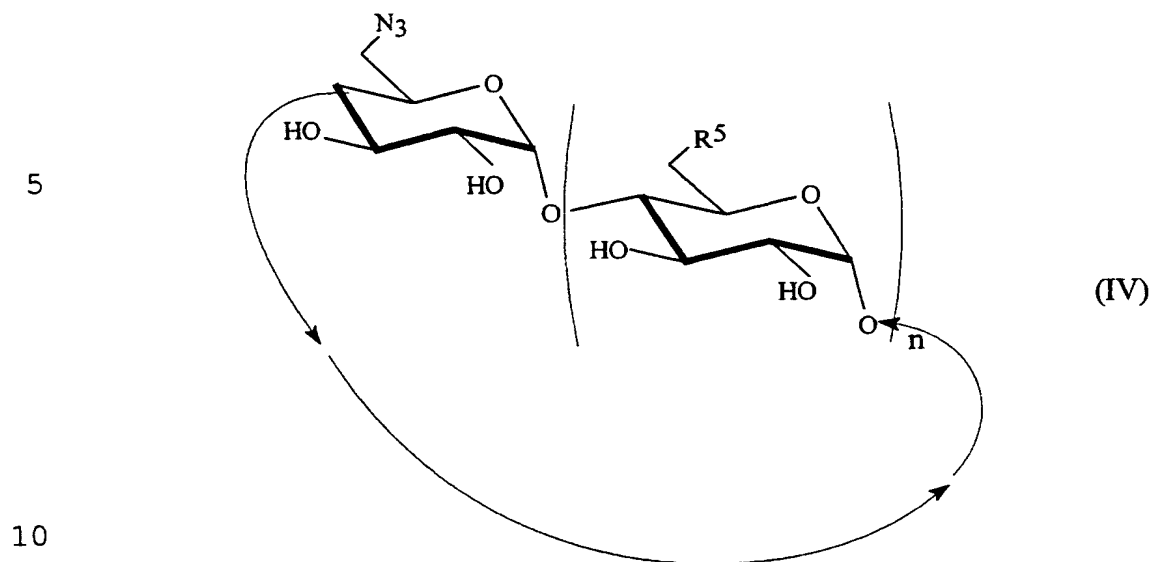


dans laquelle :

- $R^1$  représente un groupe dérivé d'un stéroïde,
  - $R^2$  représente un groupe alkyle ou aryle éventuellement substitué,
  - $R^3$  représente  $R^2$ ,
  - tous les  $R^4$  représentent  $OR^2$ , ou
  - l'un des  $R^4$  représente  $-NHCO(CH_2)_mCONHR^1$  et les autres  $R^4$  représentent  $OR^2$  à condition qu'il y ait au moins une unité glucose avec  $R^4$  représentant  $OR^2$  entre les deux unités glucose comportant le substituant  $-NHCO-(CH_2)_m-CONH-R^1$ ,
  - $m$  est un nombre entier allant de 1 à 8, et
  - $n$  est égal à 5, 6 ou 7,
- 30 qui comprend les étapes suivantes :

39

a) faire réagir un dérivé de formule :

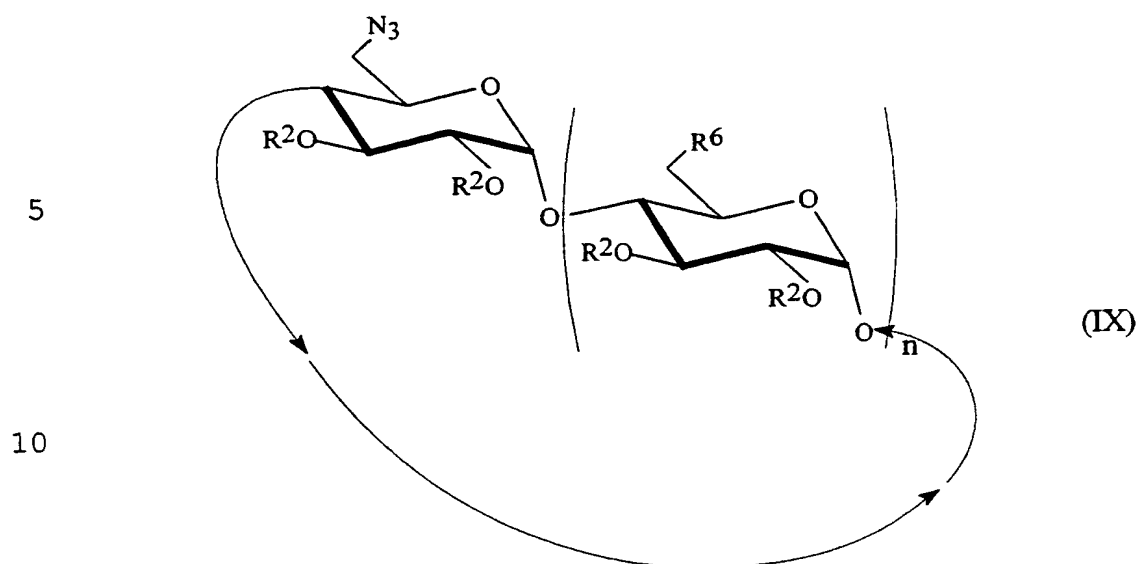


dans laquelle tous les  $R^5$  représentent OH, ou l'un des  $R^5$  représente  $-N_3$  et les autres  $R^5$  représentent OH à condition qu'il y ait au moins une unité glucose, avec

15  $R^5$  représentant OH entre les deux unités glucose comportant le substituant  $N_3$ , et n est égal à 5, 6 ou 7,

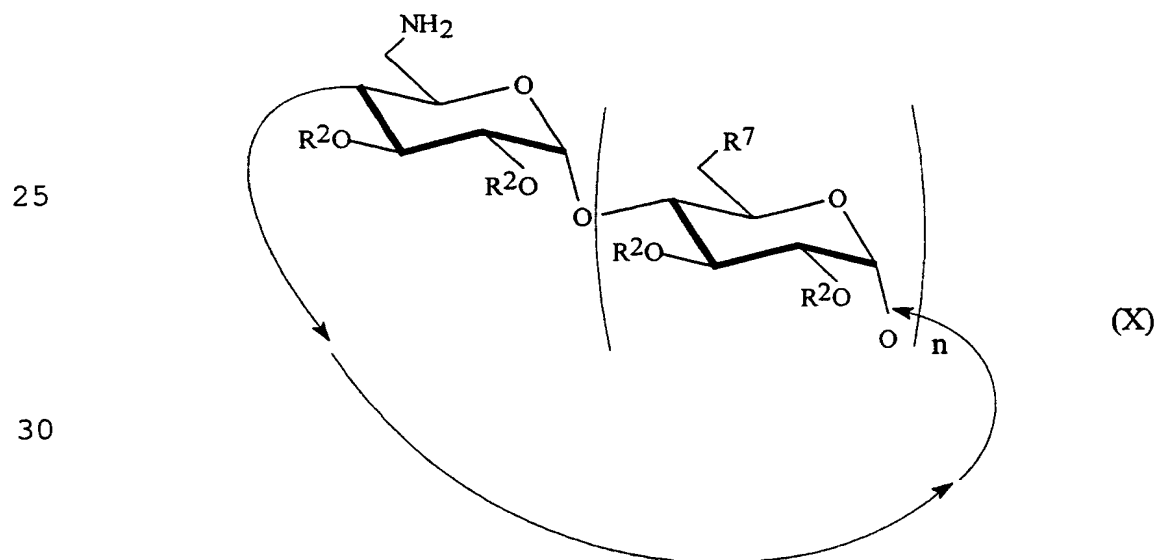
avec un iodo alcane de formule  $IR^2$  dans laquelle  $R^2$  a la signification donnée ci-dessus, en présence de NaH pour

20 pour obtenir le dérivé de cyclodextrine de formule :



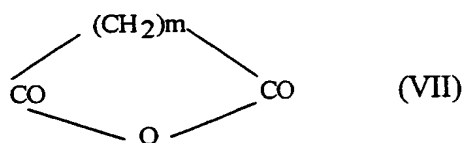
dans laquelle tous les  $R^6$  représentent  $OR^2$ , ou l'un des  
 15  $R^6$  représente  $N_3$  et les autres  $R^6$  représentent  $OR^2$ , et  
 $R^2$  et  $n$  sont tels que définis ci-dessus,

b) effectuer une réaction de Staudinger sur le  
 dérivé de formule (IX) à l'aide de triphénylphosphine  
 et d'ammoniaque pour convertir  $N_3$  en  $NH_2$  et obtenir le  
 20 dérivé de formule :

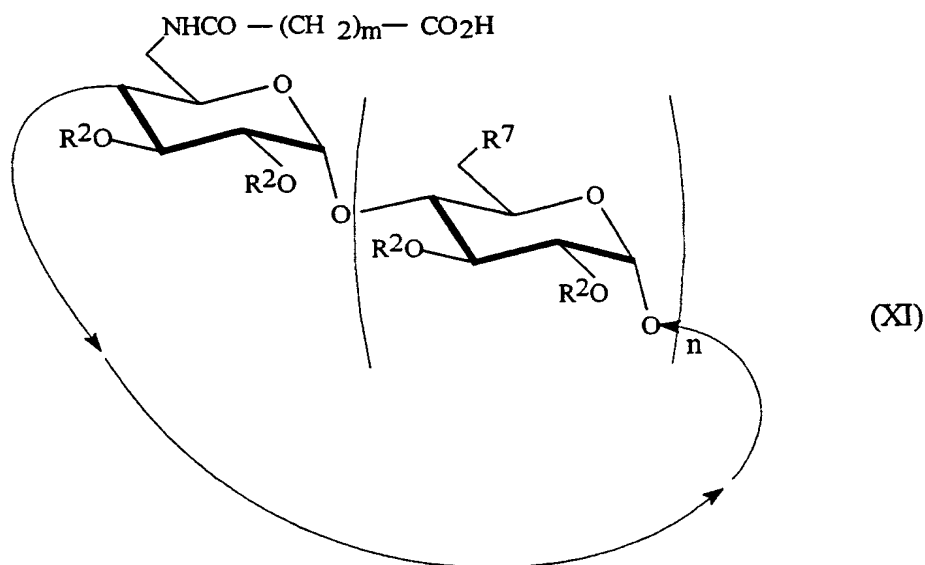


dans laquelle tous les  $R^7$  représentent  $OR^2$ , ou l'un des  $R^7$  représente  $NH_2$  et les autres  $R^7$  représentent  $OR^2$ , et  $R^2$  et  $n$  sont tels que définis ci-dessus,

c) faire réagir le dérivé de formule (X) avec  
5 un anhydride d'acide de formule :



où  $m$  est tel que défini ci-dessus, pour obtenir le dérivé de formule :



dans laquelle tous les  $R^7$  représentent  $OR^2$  ou l'un des  
 $R^7$  représente  $-NHCO-(CH_2)_m-COOH$  et les autres  $R^7$   
 30 représentent  $OR^2$ , et  $R^2$ ,  $m$  et  $n$  sont tels que définis  
 ci-dessus, et

d) faire réagir le dérivé de formule (XI) avec un composé de formule  $\text{NH}_2\text{-R}^1$  pour obtenir le dérivé de cyclodextrine de formule (I) défini ci-dessus.

10. Complexe d'inclusion d'un dérivé de cyclodextrine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et d'un composé hydrophobe.

5 11. Complexe selon la revendication 10, dans lequel le composé hydrophobe est choisi parmi les stéroïdes, les neurotropes, les bactériostatiques, les vitamines, les toniques de la paroi vasculaire et les agents de contraste.

10 12. Complexe selon la revendication 10, dans lequel le composé hydrophobe est choisi parmi l'acide 16-iodo-3-méthylhexadécanoïque, la dothiépine, le chloramphénicol, la vitame A et l'esculine.

15 13. Solution aqueuse de nanoparticules d'un dérivé de cyclodextrine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou d'un complexe d'inclusion selon l'une quelconque des revendications 10 à 12.

20 14. Système de tensioactifs organisé comprenant un dérivé de cyclodextrine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou un complexe d'inclusion selon l'une quelconque des revendications 10 à 12.

15. Système selon la revendication 14 dans lequel le tensioactif est un phospholipide.

25 16. Solution aqueuse comprenant en solution un système mixte formé à partir de vésicules de phospholipides ou de protéines membranaires, et d'au moins un dérivé de cyclodextrine selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou d'au moins un complexe d'inclusion selon l'une quelconque des revendications  
30 10 à 12.



1 / 3

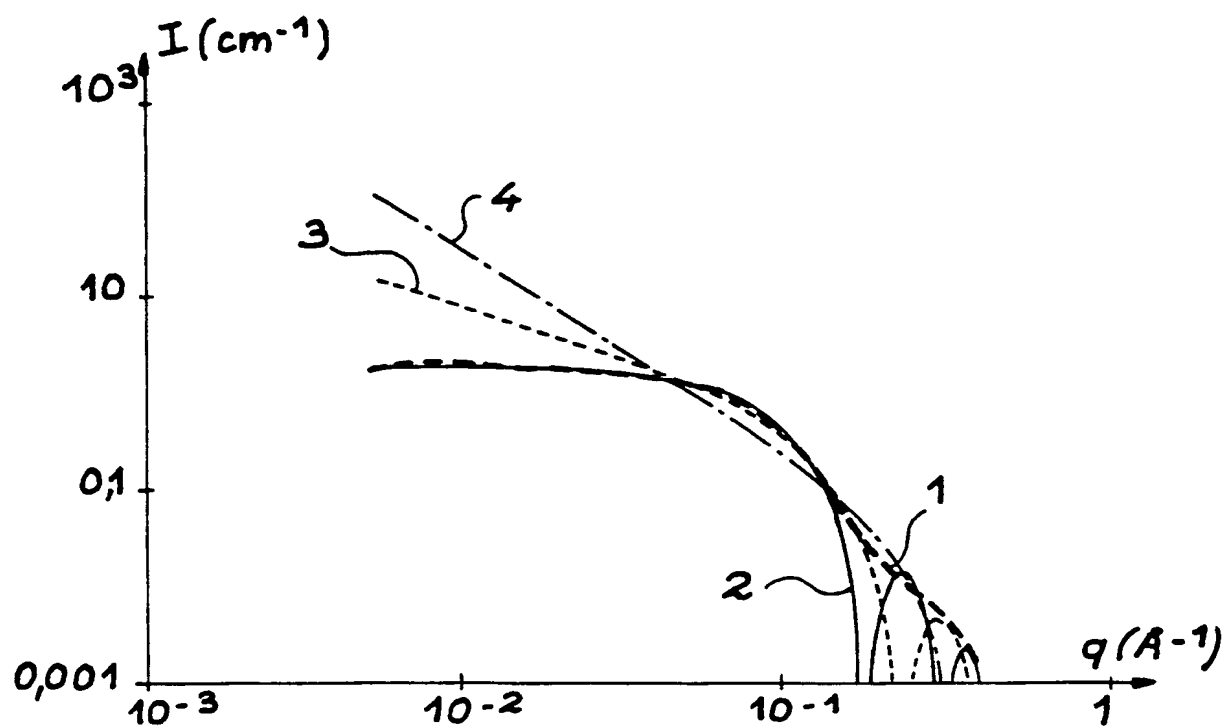


FIG. 1

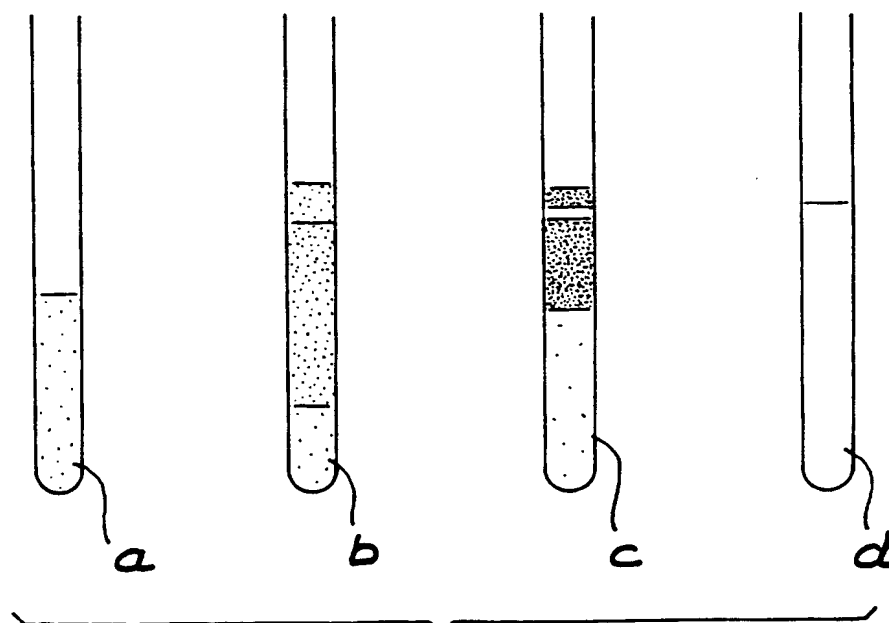


FIG. 2



2 / 3

FIG. 3

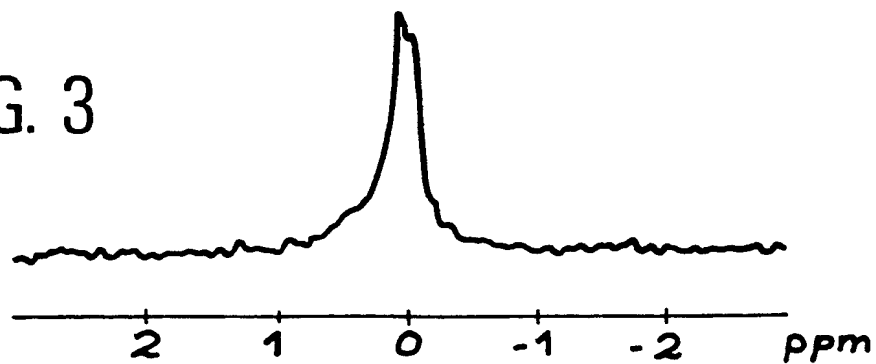


FIG. 4

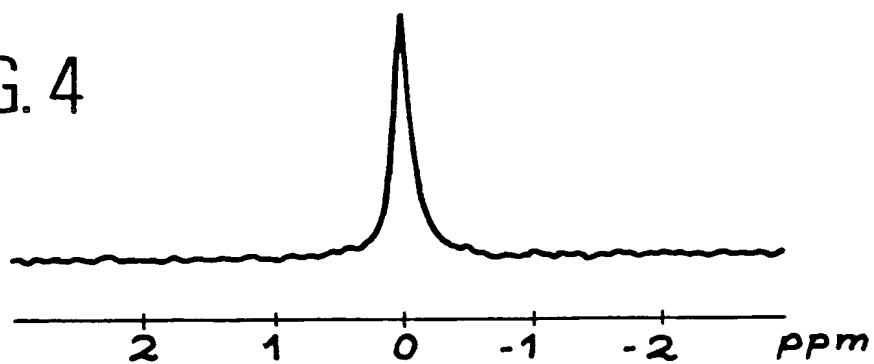
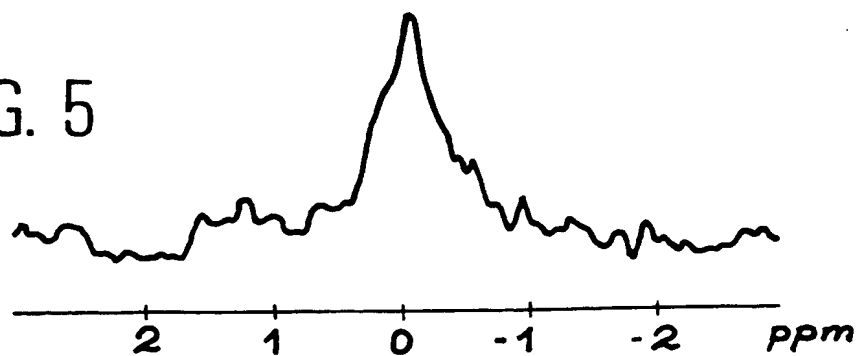


FIG. 5





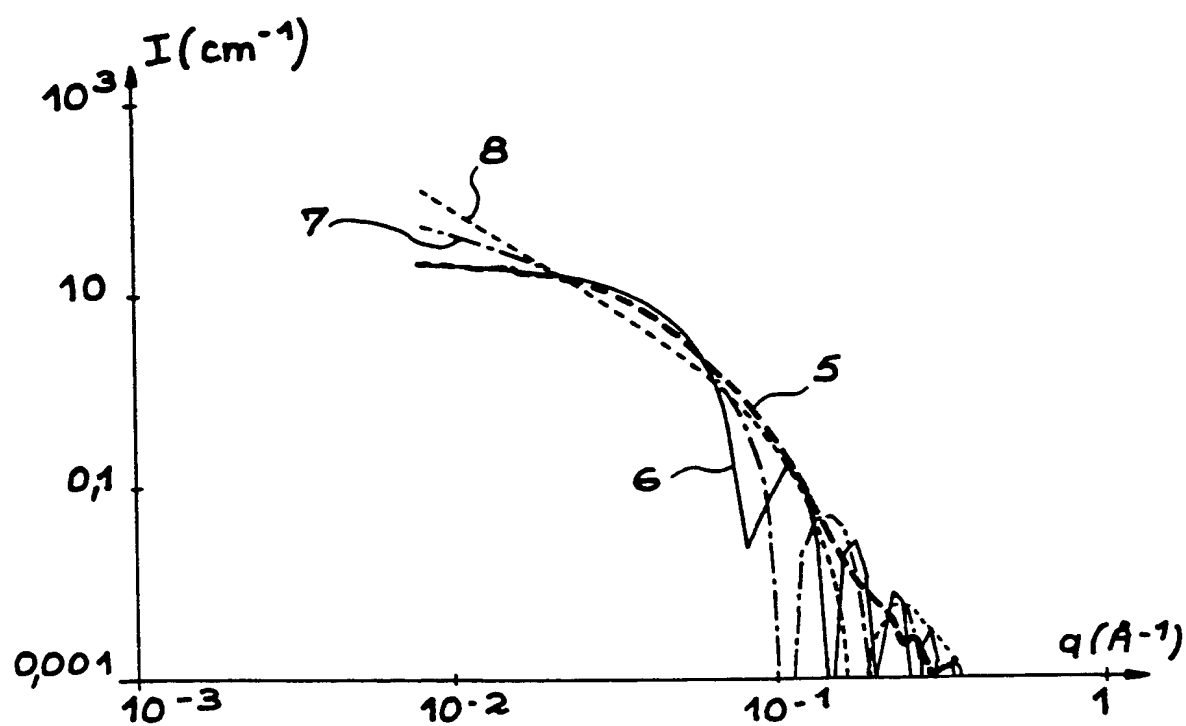


FIG. 6

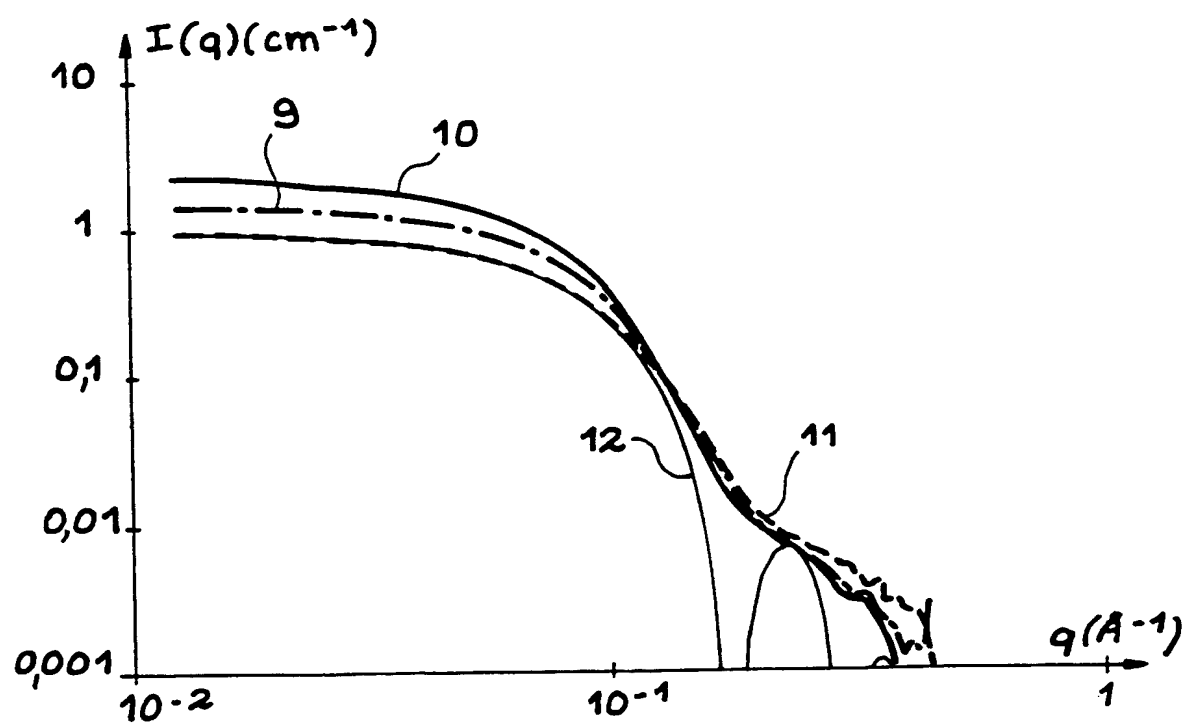


FIG. 7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01102

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C08B37/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 681 868 A (SEDERMA SA) 2 April 1993 (1993-04-02) page 3, line 5 -page 4, line 5	1,8,9
A	EP 0 751 150 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 2 January 1997 (1997-01-02) & FR 2 736 056 A (CEA) 3 January 1997 (1997-01-03) cited in the application	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 2000

Date of mailing of the international search report

09/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01102

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2681868	A	02-04-1993	NONE	
EP 751150	A	02-01-1997	FR 2736056 A	03-01-1997
			AU 699482 B	03-12-1998
			AU 5616496 A	09-01-1997
			HU 9601791 A	28-05-1997
			JP 9012605 A	14-01-1997
			US 5821349 A	13-10-1998



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01102

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C08B37/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 681 868 A (SEDERMA SA) 2 avril 1993 (1993-04-02) page 3, ligne 5 -page 4, ligne 5	1, 8, 9
A	EP 0 751 150 A (COMMISARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 2 janvier 1997 (1997-01-02) & FR 2 736 056 A (CEA) 3 janvier 1997 (1997-01-03) cité dans la demande	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/08/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux nombres de familles de brevets

Demr Internationale No

PCT/FR 00/01102

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2681868 A	02-04-1993	AUCUN	
EP 751150 A	02-01-1997	FR 2736056 A	03-01-1997
		AU 699482 B	03-12-1998
		AU 5616496 A	09-01-1997
		HU 9601791 A	28-05-1997
		JP 9012605 A	14-01-1997
		US 5821349 A	13-10-1998

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 05 APR 2001

WIPO PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

47



Référence du dossier du déposant ou du mandataire B13286.3 MDT	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01102	Date du dépôt international (jour/mois/année) 26/04/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 29/04/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C08B37/16		
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 2 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 20/10/2000	Date d'achèvement du présent rapport 02.04.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé  Gerber, M  N° de téléphone +49 89 2399 8528 



# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01102

## I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

### Description, pages:

1-17,19-21, version initiale  
23-31

18,22 reçue(s) le 10/03/2001 avec la lettre du 07/03/2001

### Revendications, N°:

1-16 version initiale

### Dessins, feuilles:

1/3-3/3 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01102

celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n<sup>os</sup> :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
voir feuille séparée

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :  
voir feuille séparée





**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants :

**D1:** FR-A-2 681 868 (SEDERMA SA) 2 avril 1993

**D2:** EP-A-0 751 150 (COMMISARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 2 janvier 1997  
& FR 2 736 056 A (CEA) 3 janvier 1997, cité dans la demande

**1. Nouveauté**

L'objet des **revendications 1-16** est nouveau par rapport à l'art antérieur disponible (Article 33(2) PCT).

D1, qui représente l'art antérieur le plus proche, décrit des dérivés amphiphiles de cyclodextrine obtenus par attachement de chaînes grasses aux groupes hydroxyles primaires des résidus glycosyles (voir le composé (IV) à la page 4, lignes 1-6, constitué de cyclodextrines monomodifiées en position 6 avec  $X = -NH-CO-R$ , **R étant une chaîne alkyle de C6 à C20 linéaire ou ramifiée, saturée ou non, hydroxylée ou non**). Ces dérivés de cyclodextrine sont utilisés dans les compositions cosmétiques, ainsi qu'en pharmacie.

Les dérivés de cyclodextrine des revendications 1 et 7 diffèrent de celui de D1 par la présence d'un groupe dérivé d'un stéroïde à l'extrémité de la chaîne aliphatique.

**2. Activité inventive**

**2.1.** L'objet des **revendications 1-7** est inventif (Article 33(3) PCT).

Le problème technique que se propose de résoudre la présente invention peut être considéré comme étant l'élaboration de dérivés amphiphiles de cyclodextrine, stables en milieu physiologique, susceptibles d'inclure des composés chimiques hydrophobes, ayant de bonnes capacités d'incorporation dans les systèmes de tensio-actifs organisés conduisant à la formation de systèmes mixtes et présentant des propriétés



d'auto-organisation en milieu aqueux.

Ni D1 ni D2 ne suggèrent de remplacer le groupement alkyle R de D1 par un substituant dérivé d'un stéroïde pour obtenir les effets désirés.

En outre, Les dérivés de cyclodextrine de D2 ne sont pas stables en milieu physiologique, leur capacité d'incorporation dans des systèmes organisés restent limitées et ils ne s'auto-organisent pas spontanément en milieu aqueux pour donner des particules de tailles et de formes bien définies.

Quant aux dérivés de cyclodextrine de D1, ils ne possèdent pas de capacité d'auto-organisation et de stabilité en milieu physiologique. La comparaison de l'exemple 8 de D1 et de la description de la présente demande à la page 18, lignes 25-27, et à la page 28, lignes 18-25, montre que les dérivés de cyclodextrine selon la présente demande conduisent à la formation d'aggrégats mixtes DMPC/cyclodextrine sphériques lors de leur mise en contact avec une suspension aqueuse de DMPC (solution limpide, transparente), ce qui n'est pas le cas dans D1 (suspension opalescente).

**2.2.** L'objet des **revendications 8-16**, concernant un procédé de préparation d'un dérivé amphiphile de cyclodextrine selon la revendication 1, des complexes d'inclusion des dérivés de cyclodextrine selon les revendications 1-7, une solution aqueuse de nanoparticules d'un dérivé de cyclodextrine selon l'une des revendications 1-7 et un complexe d'inclusion selon l'une des revendications 10-12, est également inventif (Article 33(3) PCT).

### **3. Application industrielle**

L'objet des **revendications 1-16** est susceptible d'application industrielle (Article 34(4) a) i) PCT).

### **Concernant le point VII**

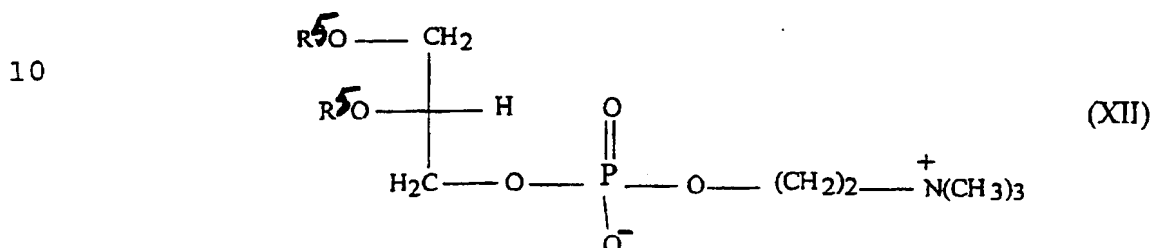
#### **Irrégularités dans la demande internationale**

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans le **document D1** et ne cite pas ce document.



-18

Aussi, l'invention a aussi pour objet un système de tensioactifs organisé comprenant un dérivé de cyclodextrine ou un complexe d'inclusion de ce dérivé conformes à l'invention. Les tensioactifs susceptibles de former de tels systèmes organisés peuvent être de différents types. A titre d'exemple, on peut citer les phospholipides répondant à la formule générale suivante :



dans laquelle  $\text{R}^5$  représente  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_p - \text{CO}$  avec  $p$  étant un nombre entier allant de 6 à 18. Ces phospholipides sont capables de former de petites vésicules unilamellaires. C'est le cas en particulier de la dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) qui répond à la formule ci-dessus avec  $p = 12$ .

Pour incorporer le dérivé de cyclodextrine ou un complexe d'inclusion de ce dérivé conformes à l'invention dans le système organisé de tensioactifs, on peut préalablement former des petites vésicules de DMPC par sonication puis ajouter dans la solution aqueuse le dérivé de cyclodextrine ou le complexe d'inclusion. Le système mixte ainsi obtenu devient alors parfaitement soluble dans l'eau conduisant à une solution limpide. Le système mixte obtenu dans ce cas précis est une micelle mixte d'un rayon moyen de 60 Å.



-22-

On recueille 0,80 g (0,60 mmol) de mono-6-azido-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6'''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose qui se présente sous la forme d'une poudre blanche.

b) Préparation du mono-6-amino-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6'''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose.

On dissout 0,75 g (0,56 mmol) du composé obtenu en a) dans 30 mL de DMF. A cette solution, on ajoute goutte à goutte et sous agitation à température ambiante 0,75 g (2,86 mmol) de triphénylphosphine dans 5 mL de DMF. Le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante pendant 2 heures, refroidi à 0°C et traité par 14 mL d'ammoniaque à 20 %. On laisse 18 heures à température ambiante sous agitation, puis le solvant est éliminé sous pression réduite et le solide résiduel est repris avec 30 mL d'eau. L'abondant insoluble de triphénylphosphine et de l'oxyde correspondant est éliminé par filtration. La solution est concentrée sous vide et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions (résine Lewatit<sup>®</sup> SP 1080 sous forme H<sup>+</sup>). On recueille 0,35 g (0,27 mmol) de mono-6-amino-6-désoxy-2,2',2'',2''',2''''',2''''',2''''',6',6'',6''',6''''',6''''',6'''''-tridéca-O-méthyl-cyclomaltoheptaose qui se présente sous la forme d'une poudre blanche.

